

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

POSGRADO EN QUÍMICA

**ANÁLISIS DE MATRICES QUÍMICAMENTE COMPLEJAS CON ENFOQUE EN
METALES/METALOIDES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN:
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Presenta:

M.C.Q. MOISÉS GUERRERO ESPERANZA

Director: Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Co-director: Dr. Kazimierz Wrobel

Miembro de comité tutorial: Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar

Guanajuato, Gto. 23 de junio del 2020

Guanajuato, Gto. Julio del 2020

Por medio de la presente me responsabilizo de la autenticidad y originalidad del presente trabajo titulado “**Análisis de matrices químicamente complejas con enfoque en metales/metaloides y espectrometría de masas**”, realizado por el M.C.Q. Moisés Guerrero Esperanza, para obtener el título de **DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS**, en las Instalaciones del Campus Guanajuato en el Departamento de Química de la Universidad de Guanajuato.

Director:

Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Co-Director:

Dr. Kazimierz Wrobel

Miembro del comité tutorial:

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar

Miembros del jurado para el examen que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas presenta el M.C.Q. Moisés Guerrero Esperanza.

SINODALES

Dr. Oracio Serrano Torres

Presidente

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Secretaria

Dra. María Maldonado Santoyo

Vocal

Dra. Ma. Eugenia Garay Sevilla

Vocal

Dr. Alan Alexander González Ibarra

Vocal

Dra. Eunice Yáñez Barrientos

Suplente

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mi mamá y a mi papá, gracias por todo su tiempo, su cariño, su esfuerzo, por nunca abandonar y por nunca haber dejado de apoyar mis metas; todo su esfuerzo fue esencial para que pudiera culminar esta parte de mi vida académica, ¡los amo con toda mi alma! A mis hermanos, Ary, Javy y Ángel, ustedes me han inspirado, siempre han estado a mi lado, siempre haciéndome pasarla bien, haciéndome reír, y siempre escuchando todo lo que pasa en mi vida, quiero dedicarles todos mis logros. Al amor de mi vida, Jazmín, eres mi apoyo incondicional, siempre en primera fila para ver y escuchar mis inquietudes, mis dudas, mis logros, mis angustias, mis chistes, gracias por todos estos años viendo cómo progresaba este trabajo, siempre deseándome lo mejor y siempre haciéndome ver el lado bueno en las cosas y brindándome consejos y comentarios tan acertivos.

A la Doctora Katarzyna Wrobel y al Doctor Kazimierz Wrobel, es difícil encontrar las palabras para describir lo mucho que les estoy agradecido, este trabajo no hubiera podido realizarse sin su gran conocimiento y experiencia en química analítica. Todo el conocimiento que he adquirido es invaluable, les estoy inmensamente agradecido por su confianza, por su apoyo, por su exigencia y por su creatividad, características que considero fundamentales para la formación de personas críticas y objetivas dedicadas a la ciencia. Fue un gusto haber podido trabajar en su laboratorio. Agradezco también al Dr. Francisco Javier, por haber formado parte de este trabajo, por tener la disponibilidad de brindar su apoyo en el laboratorio y tener siempre una actitud positiva.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Missael, Fernando, Daniel, Alan y Manuel gracias por todos los buenos momentos que pasamos dentro y fuera del laboratorio, por todo el intercambio de opiniones, consejos, conocimiento, fiestas, reuniones, fueron parte importante durante esta etapa, además de haber sido amigos entrañables.

Para la elaboración de este trabajo no solo el apoyo de muchas personas fue trascendente sino también de instituciones, por lo cual quiero agradecer a mi *alma mater*, la Universidad de Guanajuato, en cuyas aulas y laboratorios de la División de Ciencias Naturales y Exactas se fortaleció mi formación, conocimiento y experiencia tanto académica como personal. El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), ha sido vital durante toda mi formación a lo largo de estos cuatro años en el que realicé mis estudios, y es importante reconocer que el apoyo que recibí fue fundamental para lograrlo.

ÍNDICE

Resumen	1
Capítulo 1: Introducción	5
1.1. La posición de metales/metaloideos en el dominio de las ciencias “omics”	5
1.2. Metabolómica	5
1.3. Foodómica	6
1.4. Uso de espectrometría de masas en ciencias “omics”	6
1.5. Espectrometría de masas	10
1.5.1. MS en estudios de metabolómica	10
2. Objetivo general	14
3. Capítulo 3: Análisis metabolómico diferencial en orinas de pacientes con síndrome metabolómico	15
3.1. Síndrome metabolómico	15
3.1.1. Descripción del Síndrome Metabólico	15
3.1.2. Factores de riesgo y diagnóstico del Síndrome Metabólico	16
3.1.3. Causas del Síndrome Metabólico	16
3.1.4. Avances en estudios metabolómicos del Síndrome Metabólico	17
3.2. Objetivos	21
3.3. Materiales y métodos	21
3.3.1. Equipos analíticos y softwares utilizados	21
3.3.2. Reactivos	21
3.3.3. Descripción de muestras y parámetros para selección de muestras a analizar .	22
3.3.4. Análisis metabolómico de orinas mediante capHPLC-Q-TOF-MS	22
3.3.5. Hidrólisis de orinas para distinción de metabolitos de ácido indol-3-acético	24
3.4. Resultados y discusión	25
3.4.1. Parámetros y selección de muestras mediante análisis de componentes principales (PCA)	26
3.4.2. Identificación de metabolitos de mayor abundancia en orinas de pacientes con síndrome metabolómico respecto al grupo control	28
3.4.3. Separación de ácido-3-indol acético de ácido-3-indol-acético-glucuronido	33
3.4.4. Contribución de metabolitos identificados en la diferencia entre perfiles metabolómicos en orinas de pacientes con SM respecto al grupo control sano	34
3.4.5. Relevancia de los metabolitos derivados del triptófano en los pacientes con síndrome metabolómico	36
3.5. Conclusiones	38

4.	Capítulo 4: Aplicaciones de MP-AES en análisis de metales/metaloides en contexto de foodómica	40
4.1.	Importancia de los metales/metaloides en el consumo de alimentos	40
4.2.	Espectrometría atómica en estudios de foodómica	40
4.3.	Caso 1: Arsénico en tortillas de maíz.....	42
4.3.1.	Contaminación y toxicidad del arsénico.....	42
4.3.2.	Problemática del As en productos derivados de cereales	43
4.3.3.	Objetivos	43
4.3.4.	Materiales y métodos	44
4.3.4.1.	Equipos analíticos.....	44
4.3.4.2.	Reactivos y materiales.....	44
4.3.4.3.	Determinación de As total en tortillas mediante HG-MP-AES.....	44
4.3.4.4.	Separación/preconcentración de iAs mediante extracción en fase sólida con detección por espectrometría de emisión atómica con plasma sostenido por microondas (SPE-HG-MP-AES).....	46
4.3.5.	Resultados y discusión	47
4.3.5.1.	Determinación de As total en tortillas	47
4.3.5.2.	Puesta a punto de la separación/preconcentración de iAs mediante SPE-HG-MP-AES	48
4.3.5.3.	Aplicación de SPE-HG-MP-AES en muestras reales.....	50
4.3.6.	Conclusiones	50
4.4.	Caso 2: Elementos mayoritarios y minoritarios en vinos mexicanos y su potencial en la evaluación de procedencia de vinos	51
4.4.1.	Elementos minerales en vino de mesa.....	51
4.4.2.	Revisión de la metodología utilizada: análisis por dilución de estándar (SDA)	51
4.4.3.	Revisión de la metodología utilizada: calibración multi-energía (MEC)	55
4.4.4.	Objetivos	56
4.4.5.	Materiales y métodos	57
4.4.5.1.	Equipos analíticos.....	57
4.4.5.2.	Materiales y reactivos	57
4.4.5.3.	Calibración externa y adición de estándar.....	57
4.4.5.4.	Cuantificación en vinos mediante la técnica de dilución de estándar (SDA) y dilución de estándar modificado (SDAM).....	57
4.4.5.5.	Cuantificación en vinos mediante el método de calibración por multi-energía (MEC)	58

4.4.5.6.	Análisis estadísticos	59
4.4.6.	Resultados y discusión	59
4.4.6.1.	Evaluación comparativa de los distintos métodos utilizados.....	59
4.4.6.2.	Concentraciones de metales mayoritarios y traza en vinos mexicanos como potenciales indicadores de su procedencia.....	64
4.4.7.	Conclusiones	67
5.	Capítulo 5: Revisión bibliográfica sobre los enfoques analíticos de metabolómica de Se en plantas superiores.....	68
5.1.	Selenio en plantas: aspectos generales y marco teórico	68
5.2.	Enfoques metabolómicos en estudios de selenio en plantas.....	70
5.3.	Esquemas y herramientas en el análisis metabolómico	71
5.4.	Metabolización del selenio y análisis de metabolitos de selenio en plantas.....	73
5.4.1.	Rutas de captación, transporte y biotransformación del selenio	73
5.4.2.	Metabolitos de selenio reportados en plantas	74
5.4.3.	Análisis de metabolitos de selenio en plantas.....	75
5.5.	Estudio del impacto de selenio en plantas a nivel del metaboloma.....	78
5.5.1.	Respuesta bifásica de selenio en plantas.....	78
5.5.2.	Metabolitos relacionados con respuesta al estrés; marcadores del estrés y moléculas de señalización	84
5.5.3.	Metabolitos primarios.....	85
5.5.4.	Metabolitos secundarios	86
5.5.5.	Metabolómica no dirigida.....	88
5.6.	Conclusiones	89
6.	Capítulo 6: Impacto de Se(IV) en raíces de <i>Allium cepa</i> L. a nivel metabolómico.....	91
6.1.	Análisis de metabolitos mediante GC-MS.....	91
6.1.1.	Objetivos	93
6.1.2.	Análisis de compuestos volátiles de azufre y selenio utilizando el sistema HS-SPME-GC-TQMS	94
6.1.2.1.	Materiales y métodos	94
6.1.2.1.1.	Instrumentación, reactivos y muestras.....	94
6.1.2.1.2.	Crecimiento de plantas para el análisis por HS-SPME-GC-TQMS.....	94
6.1.2.1.3.	Sistema HS-SPME-GC-TQMS	94
6.1.2.2.	Resultados y discusión	95
6.1.2.2.1.	Identificación de compuestos volátiles de azufre.....	95

6.1.2.2.2.	Identificación de compuestos de selenio	98
6.1.2.3.	Conclusiones	103
6.1.3.	Análisis de metabolitos en extractos de raíces, utilizando derivatización con ECF y GC-TQMS	104
6.1.3.1.	Materiales y métodos	104
6.1.3.1.1.	Crecimiento de raíces y extracción de metabolitos	104
6.1.3.1.2.	Derivatización con etil cloroformato	104
6.1.3.1.3.	Análisis GC-MS	104
6.1.3.2.	Resultados y discusión	105
6.1.3.3.	Conclusiones	109
6.2.	Análisis metabolómico de extractos de raíces de cebolla expuestas y no-expuestas a Se(IV) analizadas mediante capHPLC-ESI-Q-TOF-MS	109
6.2.1.	Materiales y métodos	109
6.2.1.1.	Instrumentación	109
6.2.1.2.	Muestras, derivatización con etil cloroformato y análisis capHPLC-Q-TOF-MS	110
6.2.2.	Resultados y discusión	112
6.2.3.	Conclusiones	117
7.	Experimentos <i>in vitro</i> enfocados en la síntesis de seleno-metil-Se-cisteína	119
7.1.	Objetivos	119
7.2.	Materiales y métodos	119
7.2.1.	Reactivos e instrumentación	119
7.2.2.	Composición de las soluciones <i>in vitro</i>	120
7.3.	Resultados y discusión	120
7.3.1.	Mezclas de selenio, aminoácidos y cofactores	120
7.4.	Conclusiones	123
8.	Conclusiones	124
	Bibliografía	128
	Anexo I: Determination of total arsenic and speciation analysis in Mexican maize tortillas by hydride generation - microwave plasma atomic emission spectrometry and high performance liquid chromatography - inductively coupled plasma - mass spectrometry	144
	Anexo II: Determination of major and minor elements in Mexican red wines by microwave-induced plasma optical emission spectrometry, evaluating different calibration methods and exploring potential of the obtained data in the assesment of wine provenance	154

Índice de figuras

- Fig. 1. 1: Gráfica de puntaje del modelo de análisis de componentes principales (PCA) de 102 individuos (52 pacientes con SM y 50 pacientes sanos) utilizando los 23 parámetros descritos en la sección 2.2.3. -1: pacientes sin SM detectado (controles). 1: pacientes..... 26
- Fig. 1. 2: Modelo PCA construido con base a 23 parámetros antropogénicos y clínicos evaluados en 11 pacientes con SM y 13 controles. a) gráfica de puntajes que muestra la distribución de individuos en las coordenadas de los dos primeros componentes principales; b) gráfica de influencia de variables que muestra la distribución de los 23 parámetros analizados en las mismas coordenadas PC1 y PC2. 27
- Fig. 1. 3: Cromatogramas deconvolucionados obtenidos en capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS para una muestra Control y una de SM, elegidas aleatoriamente. 29
- Fig. 1. 4: Gráfica volcano obtenida al aplicar una prueba t para comparar los datos de capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS entre dos grupos de pacientes. En color amarillo se marcan las características moleculares de mayor abundancia en SM, aplicando los criterios: Razón de cambio ≥ 3 y un valor de significancia $p \leq 0.01$ 30
- Fig. 1. 5: Identificación de ácido indol-3-acético-O-glucoronido. a) Espectro de masas adquirido en el tiempo de retención 6.94 min. b) Cromatograma de ion extraído de ácido indol-3-acético (tiempo de retención 9.46 min) y su conjugado glucoronido (tiempo de retención 6.94 min) obtenido para los 24 sujetos analizados (rojo: pacientes con SM; azul: pacientes sanos)..... 32
- Fig. 1. 6: Anotación de indol-3-carbaldehído y de ácido indol-3-acético con base en espectros MS y MS/MS. a) Cromatograma de ion extraído para los valores m/z 176.0705 ± 0.05 (ácido indol-3-acético) y m/z 146.0597 ± 0.05 (indol-3-carbaldehído) b) Arriba, escaneo total del espectro de MS adquirido en el tiempo de retención 9.5 ± 0.1 min; en medio y abajo, espectro de los dos iones precursores m/z 176.0705 y m/z 146.0597, respectivamente..... 32
- Fig. 1. 7: a) Cromatogramas con detección fluorimétrica: – orina de un voluntario después de pretratamiento SPE. (---) la misma muestra con una adición de estándar de 3IAA 20 mg L⁻¹. b) Espectros de emisión adquiridos en el ápex de los dos picos cromatográficos en un rango de 320-480 nm con una λ de excitación de 278 nm: (–) Tiempo de retención 4.2 min (3IAA-G) y (---) tiempo de retención 11.4 min (3IAA) c) Espectros de absorción adquiridos en el ápex de los dos picos cromatográficos 240-380 nm: (–) tiempo de retención 4.2 min (3IAA-G) (---) tiempo de retención de 11.4 min (3IAA)..... 33

Fig. 1. 8: Cromatogramas HPLC-FLD de dos alícuotas de orina de un voluntario, calentadas a 80 °C durante 1 h, con un posterior tratamiento de preconcentración con cartuchos SPE: (–) muestra control sin hidrolizar y (---) alícuota de la misma muestra después de la hidrólisis ácida.	34
Fig. 1. 9: Diagramas de caja y bigotes generados por MetaboScape para los 6 metabolitos identificados en pacientes con SM (cajas grises) y del grupo control (cajas blancas). El valor promedio está representado por la línea sólida dentro de cada caja, y los extremos de la caja representan el 75 y 25 percentil, las líneas exteriores de las cajas (bigotes) denotan los percentiles 5 y 95, respectivamente, los círculos dentro y fuera de las cajas corresponden a las medias y los valores atípicos, respectivamente. Todos los cambios fueron significativos a $p < 0.05$	35
Fig. 1. 10: Metabolitos de orina asignados como la principal contribución en la diferencia entre sujetos con SM y el grupo control, integrado con un esquema general del metabolismo de triptófano. (Gris utilizado para remarcar las rutas del huésped, estudiado comúnmente en muestras de suero o de sangre. (---) indica que bajo los criterios aplicados de razón de cambio y valor de significancia p , no se encontraron intermediarios entre el triptófano y el 3IAA afectados por la condición de SM.	38
Fig. 2. 1: Sistema de introducción de muestra para generación de hidruros (HG). (a) Conexión tipo T donde se unen los flujos de la muestra o estándares conectado con el flujo de HCl 8 mol L-1. (b) Área de contacto entre agente reductor (NaBH ₄) y muestra acidifica, para llevar a cabo la reacción de HG. (c) Nebulizador Miramist.	46
Fig. 2. 2: Diagrama típico de adquisición durante SDA (ejemplo del caso de Fe (373.713 nm) e Y (371.029 nm) en vinos mediante MP-AES). (a) Monitoreo de la señal de un blanco (SB). (b) Monitoreo de la S2, con un contenido de la muestra de vino diluido 1:1 con HNO ₃ 2 % y con adición de estándares (ejemplo Fe) y estándar interno (Y) (c) Monitoreo de la S1 al verter la S2, produciéndose una disminución de las señales debido a la dilución provocada por el hecho que la S2 es la muestra sin adiciones de estándar.	53
Fig. 2. 3: Calibración típica de SDA analizada para Fe en vinos mediante MP-AES, utilizando los puntos de la Fig. 2.2 región c y los valores de las concentraciones de la dilución del IS.	53
Fig. 2. 4: Proceso de la calibración en el análisis MEC graficando los valores de intensidad de cinco longitudes de onda distintas para la solución (M+S) en el eje x, y los valores de intensidad de las mismas cinco longitudes de onda para la solución (M+B), obtenidas mediante MP-AES en una muestra de vino.	55
Fig. 2. 5: Aplicación de SDA para el caso de Mn en vinos. a) SDA: gráfica de adquisición en tiempo real para Mn e Y como IS. b) SDA: regresión lineal de la curva de calibración, graficando la relación de las intensidades de la señal del analito entre la del IS (Int Mn / Int Y) con respecto a los recíprocos de la concentración del IS (1/[Y]) en cada punto de la región de dilución.	60
Fig. 2. 6: Aplicación de SDAM a) Espectros adquiridos para Mn b) Espectros adquiridos para Y como IS c) Curva de calibración obtenida para SDAM.	61

Fig. 2. 7: Aplicación de MEC para la determinación de Mg en vinos. M+B: muestra con blanco; M+S: muestra con adiciones de estándar. a) Gráfica de calibración obtenida para seis longitudes de onda analíticas (derecha) y en el lado izquierdo se presenta una ampliación donde se muestran cuatro longitudes de onda de baja intensidad. b) Espectros de M+B (-) y M+S (---) adquiridos a cada una de las longitudes de onda. 62

Fig. 2. 8: Concentraciones de los elementos analizados en vinos mexicanos, cada barra representa el promedio con la respectiva desviación estándar, con base en resultados individuales obtenidos para todas las muestras de las regiones vinícolas: Gto-Guanajuato, Ags-Aguascalientes, BC-Valle de Guadalupe, B.C. a) Elementos minoritarios. b) Elementos mayoritarios. 65

Fig. 2. 9: Modelo bidimensional obtenido por análisis de componentes principales para las concentraciones de diez elementos en doce muestras de vinos mexicanos; los primeros componentes principales (PC1 y PC2) representan el 49 % y 25 % de la variabilidad total de los datos. a) Gráfico de puntuaciones que muestra la distribución de las muestras de acuerdo a su región vinícola: G1-G4-Guanajuato; A1-A3-Aguascalientes; V1-V5-Valle de Guadalupe, B.C. b) Gráfico de influencia que muestra la distribución de los elementos en el mismo espacio bidimensional que el gráfico de puntuaciones..... 66

Fig. 3. 1: Clasificación general de las plantas de acuerdo a su capacidad para adaptarse a condiciones en presencia de Se. p.s.: Peso seco..... 69

Fig. 3. 2: Aspectos clave en los enfoques metabólicos realizados en plantas expuestas a selenio. .. 70

Fig. 3. 3: Enfoques en el análisis de metabolitos de plantas expuestas a Se. (BMM-baja masa molecular, GO-glioxal, MGO-metliglioxal, HR-alta resolución) 72

Fig. 3. 4: Esquema general de los procedimientos de pretratamiento de muestras utilizado en Se-metabolómica 77

Fig. 4. 1: Cromatograma de ion extraído m/z 45 donde se indican algunos compuestos identificados de azufre. (---) Cebollas control no-expuestas (-) Cebollas expuestas a Se(IV)..... 96

Fig. 4. 2: Cromatograma de ion extraído m/z 95. (-) Cultivos control no-expuestos. (---) Cultivos expuestos a Se(IV). Se observan tres señales que aparecen únicamente en el grupo expuesto, las cuales corresponden en orden de elución a los compuestos DMSe, DMDSe y PrSeSM..... 98

Fig. 4. 3: Espectros obtenidos en GC-MS para las señales encontradas en las cebollas expuestas a Se. a) En la parte superior, espectro adquirido en el tiempo de retención 2.4, en la parte inferior espectro de DMSe de la base de datos NIST. b) En la parte superior, espectro adquirido en el tiempo de retención 6.8, en la parte inferior espectro de DMDS de la base de datos NIST. c) Espectro de masas adquirido en el tiempo de retención 8.9 min.	99
Fig. 4. 4: Espectro de masas y fragmentación propuesta de metilalilselenio ($M^+ = m/z$ 136, TR=5.1 min)	100
Fig. 4. 5: a) Espectro experimental obtenido para HS de cebollas expuestas a Se(IV) TR: 5.5 min. b) Espectro de masas obtenido por Gabel-Jensen et al para una reacción de DMDS con DMDS, identificando el compuesto MSeSM ([309]	100
Fig. 4. 6: a) Espectro de masas y fragmentación propuesta para el metabolito metil-pentil selenio (TR: 8.5 min). b) Espectros de selenoacetaldehídos con un ion molecular m/z 166 obtenidos por Matich et al en plantas <i>N. tabaccum</i> expuestas a Se [310].	101
Fig. 4. 7: Espectro de masas adquirido en el tiempo de retención 8.9 min y fragmentación propuesta para la molécula de PrSeSM	102
Fig. 4. 8: Cromatograma de iones totales de una muestra de aminoácidos derivatizados con ECF y etanol mediante GC-MS. Negro- aminoácidos a una concentración de 25 nmol mL ⁻¹ , Rojo- aminoácidos a una concentración de 10 nmol mL ⁻¹	107
Fig. 4. 9: Espectros de masas obtenidos en GC-MS para estándares derivatizados con ECF y etanol de a) MeSeCys b) Se-Met y c) (Se-Cys) ₂	108
Fig. 4. 10: Cromatogramas deconvolucionados obtenidos en capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS para una muestra de cebollas no expuesta y una de cebollas expuestas a 25 mgSe L ⁻¹ , elegidas aleatoriamente.	113
Fig. 4. 11: Gráfico de nubes obtenido en la comparación de los cromatogramas de dos grupos de muestras: cebollas no-expuestas y cebollas expuestas a Se(IV) (25 mgSeL ⁻¹), realizado mediante la plataforma XCMS para visualizar iones con cambios de abundancia entre grupos con una razón de cambio >2 a nivel estadístico $p < 0.05$	113
Fig. 4. 12: Estructura de cisteína y del ácido 2-amino-2-sulfanil acético.	117
Fig. 5. 1: Metabolismo de Se reproducido de la base de datos KEGG, marcando los metabolitos de interés y la ruta alterna de la síntesis de MeSeCys propuesta en este trabajo.	121

Fig. 5. 2: Identificación y fragmentación propuesta de MeSeCysO, producto de la reacción de alanina, AMSe y PLP. a) Patrón isotópico obtenido de la reacción Ala+AMSe+PLP analizada mediante ESI(+)-Q-TOF-MS. b) Patrón isotópico protonado [M+H]⁺ de la fórmula molecular de MeSeCysO (C₄H₉NO₃Se). c) Espectro MS/MS del ion m/z 199.9825 122

Fig. 5. 3: Reacción producida en mezclas in vitro para producir MeSeCysO y reacción propuesta para la síntesis de MeSeCys en plantas expuestas a Se..... 123

Índice de tablas

Tabla 1. 1: Algunos ejemplos de estudios metabolómicos dirigidos, realizados a distintas muestras para pacientes con afecciones de SM o diabetes.....	18
Tabla 1. 2: Parámetros utilizados para el análisis de muestras de orinas mediante cromatografía de líquidos en escala capilar y espectrometría de masas de alta resolución (capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS).....	23
Tabla 1. 3: Parámetros utilizados para el análisis cromatográfico de orinas y del estándar de 3IAA procesados mediante SPE tipo HLB, mediante HPLC-DAD/FLD.....	25
Tabla 1. 4: Parámetros clínicos y antropométricos medidos para 24 sujetos seleccionados con base a PCA para el análisis metabolómico. Los valores de significancia p fueron obtenidos aplicando la prueba estadística t de dos colas.....	27
Tabla 1. 5: Lista de metabolitos de mayor abundancia en SM respecto al grupo control, detectados mediante prueba t e identificados con ayuda de MetaboScape	30
Tabla 1. 6: Contribución de metabolitos identificados en diferencia entre perfiles metabólicos de orina de pacientes con SM y pacientes sanos.....	35
Tabla 2. 1: Condiciones de operación instrumental del sistema HG-MP-AES.....	45
Tabla 2. 2: Concentración de As total (tAs) en distintas muestras reales mediante el método propuesto de HG-MP-AES comparado con resultados previos evaluados mediante ICP-MS. (Se muestran los valores promedio \pm SD para tortillas (T1-T7), una muestra de arroz (R1)	48
Tabla 2. 3: Típicos parámetros analíticos evaluados para la determinación de iAs mediante SPE acoplado “off-line” en HG-MP-AES o en ICP-MS y los resultados obtenidos en las muestras de T1 y W2.....	49
Tabla 2. 4: Longitudes de onda utilizadas para llevar a cabo la cuantificación por MEC mediante MP-AES en muestras de vinos.....	58
Tabla 2. 5: Parámetros instrumentales utilizados en MP-AES para las metodologías MEC y SDAM.....	59

Tabla 2. 6: Comparación de los tres métodos de cuantificación utilizados en este trabajo para la determinación de elementos directamente en vinos diluidos. (SA-adición de estándar, SDAM-análisis de dilución de estándar modificado, MEC-calibración multienergía). Los números romanos I, II y III son utilizados para indicar orden decreciente.....	63
Tabla 3. 1: Esquema general de estudios recientes en la evaluación del impacto de Se en el metabolismo de plantas	78
Tabla 4. 1: Propiedades de algunos tipos de recubrimientos de fibras utilizadas para SPME [290, 291]	92
Tabla 4. 2: Parámetros utilizados para el análisis Headspace de cebollas expuestas y no-expuestas mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (HS-SPME-GC-EI-MS).....	95
Tabla 4. 3: Compuestos volátiles de azufre identificados en cebollas no-expuestas y expuestas a Se(IV).....	97
Tabla 4. 4: Metabolitos volátiles de Se identificados en muestras de cebollas expuestas a Se(IV).102	
Tabla 4. 5: Parámetros utilizados para el análisis de metabolitos derivatizados con ECF mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-TQMS)	105
Tabla 4. 6: Tiempos de retención de aminoácidos derivatizados con ECF y pico base utilizado para la identificación en GC-MS.....	106
Tabla 4. 7: Lista de metabolitos derivatizados con ECF de mayor abundancia en comparación con los grupos de cebolla control no-expuesto y expuestos a Se(IV), detectados mediante prueba t e identificados con ayuda de NIST 2.0 en GC-MS.....	108
Tabla 4. 8: Parámetros utilizados para el análisis de extractos de raíces expuestas y no-expuestas a Se(IV) derivatizadas con ECF, mediante cromatografía de líquidos en escala capilar y espectrometría de masas de alta resolución (capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS)	110
Tabla 4. 9: Aductos definidos para la identificación de compuestos en XCMS, utilizando la diferencia de masa por la contribución de la derivatización con ECF y etanol.	111
Tabla 4. 10: Estándares de aminoácidos derivatizados con ECF y su identificación en capHPLC-ESI-Q-TOF-MS	114

Tabla 4. 11: Lista de metabolitos de mayor abundancia en las cebollas expuestas a Se(IV) (25 mgSe L-1) respecto al grupo control no-expuesto. 116

Índice de abreviaturas

(Cys) ₂	Cistina
(SeCys) ₂	Selenocistina
2ASA	Ácido 2-amino sulfanilacético
3IAA	Ácido indol-3-acético
3IAA-G	Ácido indol-3-acético-O-glucurónido
3-IAld	Indol-3-carbaldehído
3ICA	Ácido 3-indol carboxílico
ACC	1-amino-ciclopropano-carboxilato
ACN	Acetonitrilo
Ado-SeHCy	Adenosil seleno-homocisteína
Ado-SeMet	Adenosil seleno-metionina
AMSe	Ácido metilselenínico
CAest	Concentración del estándar de analito agregado en el método SDA/SDAM
CaM	Concentración del analito presente en la muestra en el método SDA/SDAM
capHPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución en escala capilar
CE	Electroforesis capilar
CIS	Concentración de estándar interno en el método SDA/SDAM
Cys	Cisteína
DAD	Detección espectrofotométrica de arreglo de diodos
DE	Desviación estándar
DMDS	Dimetil disulfuro
DMDS _e	Dimetil diselenio
DMS	Dimetil sulfuro
DMSe	Dimetil selenio
DPDS	Dipropil disulfuro
DPTS	Dipropil trisulfuro
DVB	Divinil benceno
EC	Calibración externa
ECF	Etil cloroformato
EGCM	Módulo de control de gas externo
EI	Ionización por impacto electrónico
ESI(+)	Ionización por electronebulización en modo positivo
FLD	Detección fluorimétrica
GC-FID	Cromatografía de gases con detector por ionización en flama
GC-MS	Cromatografía de gases con detector por espectrometría de masas
GluMeSeCys	g-glutamil selenometil selenocisteína
GO	Glioxal
Hcy	Homocisteína
HDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad
HG	Generación de hidruros
HILIC	Cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica

HLB	Cartucho SPE de balance hidrofílico-lipofílico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HS	Headspace
iAs	Arsénico inorgánico
ICP-MS	Espectrometría de masas con ionización por plasma de acoplamiento inductivo
IntCov	Concordancia entre los fragmentos experimentales y los fragmentos <i>in silico</i> de las bases de datos
IS	Estándar interno
iSe	Selenio inorgánico
LC	Cromatografía de líquidos
LC-HR-MS	Cromatografía de líquidos con espectrometría de masas de alta resolución
LDC	Límite de cuantificación
LDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad
LIFD	Detección por fluorescencia inducida por láser
m/z	Relación masa/carga
M+B	Solución utilizada en MEC que consiste en la muestra diluida 1:1 con blanco
M+S	Solución utilizada en MEC que consiste en la muestra diluida 1:1 con una mezcla de analitos
MeAlilSe	Metil alilselenio
MEC	Calibración multi-energía
MeCys	S-metil cisteína
MeSeCys	Se-metil selenocisteína
MeSeCysO	Se-metil selenocisteína selenóxido
MeSeMet	Metil selenometionina
Met	Metionina
MGO	Metilglioxal
MP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas sostenido por nitrógeno
MPDS	Metil propil disulfuro
MPenSe	Metil pentil selenio
MSeSM	Dimetil selenosulfuro
MSIS	Cámara de introducción de muestras múltiple
MSTFA	N-Trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
oSe	Selenio orgánico
PCA	Análisis de componentes principales
PDMS	Poli dimetilsiloxano
PLP	Piridoxal-5-fosfato
PLS	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PrSeSMe	Propil selenosulfenil metilo
PS	Presión sistólica
Q-TOF-MS	Espectrómetro de masas de alta resolución con analizador de masas cuadrupolo - tiempo de vuelo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Cromatografía de tipo fase inversa
S1	Solución utilizada en SDA que consiste en la muestra y los estándares a cuantificar a una concentración conocida, además de un estándar interno (1:1)

S2	Solución utilizada en SDA que consiste en la muestra diluida con blanco (1:1)
SA	Adición de estándar
SAX	Intercambio aniónico fuerte
SDA	Análisis por dilución de estándar
SDAM	Análisis por dilución de estándar modificado
SeCys	Selenocisteína
SeHLan	Seleno-homo lantionina
SeLan	Seleno-lantionina
Se-Met	Seleno metionina
SM	Síndrome metabólico
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Micro extracción en fase sólida
TG	Triglicéridos
TR	Tiempo de retención
VIP	Importancia de variable en la proyección
VLDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de muy baja densidad

Resumen

El objetivo principal del proyecto de tesis fue contribuir en el desarrollo metodológico para el análisis de materiales químicamente complejos enfocándose en aplicaciones relacionadas con metabolómica y foodómica. Los componentes de la muestra distintos al(los) analito(s) que se desea caracterizar y/o determinar, pueden afectar los resultados finales interfiriendo en las etapas de pretratamiento de muestra y también durante el análisis instrumental. Es por ello que el establecimiento de procedimientos confiables, cuyo desempeño no sea deteriorado por la matriz química de la muestra, es un tópico actual en diferentes áreas de la ciencia y en aplicaciones rutinarias, incluyendo estudios del metabolismo en diversos organismos vivos y en diferentes aspectos del análisis de alimentos. Los materiales de interés en este trabajo comprendieron orinas humanas, tortillas de maíz mexicanas, vinos tintos mexicanos y por último cebollas bajo exposición a Se(IV).

En el Capítulo 3 se describen los resultados del análisis metabolómico no dirigido en el que se comparan los perfiles de metabolitos en orinas de individuos diagnosticados con síndrome metabólico (SM) comparando con un grupo control sano. El SM es una condición multifactorial que aumenta el riesgo de padecer diabetes y enfermedades cardiovasculares, por lo que la caracterización de esta enfermedad a nivel de los metabolitos es importante para una mayor comprensión de la etiología y proporcionar información relevante para su diagnóstico. Para este estudio, se consideraron 100 voluntarios diagnosticados con SM y 80 individuos sanos; con base en 23 parámetros clínicos y antropométricos evaluados en cada uno de los pacientes, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA), logrando elegir 11 personas con SM y 13 individuos sanos con mayor varianza entre ambos grupos en el modelo, es decir, los que fueron más representativos para cada uno de estos grupos. Se recolectó ambulatoriamente la primera orina de la mañana de cada paciente, utilizando para cada caso 20 μL , los cuales fueron diluidos con 80 μL de metanol para ser analizado mediante capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS, utilizando una columna de fase inversa. El procesamiento de datos se llevó a cabo utilizando MetaboScape 3.0 (Bruker Daltonics) para obtener las características moleculares. Para la selección de compuestos con mayores diferencias de abundancia entre ambos grupos, se realizó un análisis t-student. Se identificaron los siguientes seis metabolitos con mayor abundancia en SM, los cuales tuvieron una contribución importante en la diferencia entre grupos: ácido indol-3-acético, ácido indol-3-acético-O-glucurónido, N-(indol-3-ilacetil) glutamina, indol-3-carbaldehído, ácido indol-3-carboxílico e hidroxihexanoicarnitina. Cinco de estos metabolitos pertenecen a compuestos indólicos derivados del catabolismo del triptófano por la flora bacteriana intestinal, siendo los más importantes el ácido indol-3-acético y dos de sus conjugados, el primero con ácido glucurónico y el segundo con glutamina. Estos resultados sugieren que el 3IAA así como los metabolitos indólicos, podrían ser candidatos importantes como biomarcadores del SM.

La siguiente parte del proyecto se centró en el uso de espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas sostenido por nitrógeno (MP-AES) en el área de foodómica (Capítulo 4). Partiendo de los principales objetivos de la foodómica que son: (i) establecer metodologías analíticas para garantizar la seguridad de alimentos, (ii) descubrir biomarcadores que detecten productos inseguros, (iii) avanzar en la comprensión del papel de compuestos nutricionales a nivel molecular, y (iv) asentar las bases para la producción de alimentos funcionales, en el primer caso experimental, se desarrolló un procedimiento de cuantificación de arsénico inorgánico (iAs) en tortillas de maíz que podría ser utilizado con fines de garantizar la seguridad alimenticia (Capítulo 4.3). Específicamente, se finalizó el trabajo iniciado en el proyecto de maestría, en el cual la aportación original consistió en el uso de

Te(IV) como estándar interno para la determinación de As mediante generación de hidruros y MP-AES. Para lograr la selectividad de iAs en el procedimiento, se llevó a cabo la extracción en fase sólida (SPE), utilizando cartuchos de intercambio aniónico modificados con AgCl (SAX-AgCl) y elución de iAs con HNO_3 0.06 mmol L^{-1} . La recuperación de iAs en los extractos de tortilla fue de 73.4 %, pero el procedimiento desarrollado resultó ser más adecuado para el análisis de aguas naturales, que es una muestra de composición química mucho más simple que la tortilla.

Siguiendo el contexto de análisis foodómicos basado en el uso de MP-AES, el segundo caso fue la determinación de elementos mayoritarios y trazas en vinos mexicanos (Capítulo 4.4). La importancia de este estudio se debe a que los perfiles de metales/metaloideos influyen en las propiedades sensoriales y nutricionales de los vinos, además de facilitar la determinación del origen geográfico de estos productos. Para simplificar el procedimiento, se decidió usar una dilución de vinos en la etapa de pretratamiento, dejando como el reto principal del trabajo lograr la cuantificación en condiciones libres de interferencias. Se evaluaron comparativamente distintos métodos de cuantificación, los cuales fueron: calibración externa (EC), método de adición de estándar (SA), método de dilución de estándar (SDA) y calibración multi-energía (MEC). Con base en los resultados obtenidos en la aplicación de SDA, se propusieron algunas modificaciones (SDAM) que permitieron mejorar el desempeño del método original. Se demostró la utilidad del SDAM para la cuantificación de metales traza (Rb, Sr, Mn, Fe, Cu y Al) mientras que para los elementos mayoritarios (K, Na, Ca, Mg), el método más adecuado resultó ser MEC. En el análisis de una serie de vinos mexicanos, ambos métodos proporcionaron resultados congruentes con el método SA, pero con las siguientes ventajas: (i) operativamente muy simples, (ii) sin corrección de línea base y (iii) sin interferencias. Las concentraciones de los elementos en vinos mexicanos producidos en tres diferentes regiones geográficas se sometieron al análisis de componentes principales (PCA), observándose una clara separación de estos productos, provenientes de Guanajuato, Valle de Guadalupe y Aguascalientes. Específicamente, se observó que K, Rb, Sr y Ca son variables asociadas con vinos de Guanajuato, mientras que Na, Cu y Mn están estrechamente relacionados con las muestras provenientes de Valle de Guadalupe (Baja California). El Mg se asoció tanto con los vinos provenientes de Guanajuato como de Baja California, mientras que el Fe, Al y Sr fueron asociados a vinos de la región de Aguascalientes. Estos resultados son prometedores, ya que demuestran la capacidad del MP-AES en estudios de proveniencia de vinos mexicanos con base en la determinación de metales mayoritarios y traza.

En la última parte del proyecto de tesis, el objetivo fue incidir en el conocimiento sobre el impacto de Se(IV) en plantas comestibles, a nivel metabólico. Para ello, se realizó el estudio bibliográfico sobre este tema (Capítulo 5) y a continuación se estudiaron cebollas cultivadas hidropónicamente en presencia de Se(IV) (Capítulo 6). Específicamente se llevó a cabo un análisis metabólico no dirigido, enfocado en la comparación de cebollas expuestas y no-expuestas a Se(IV). Inicialmente se analizaron los metabolitos volátiles presentes en el headspace de los cultivos; para esto se realizó la extracción de metabolitos mediante SPME con fibras tipo PDMS-DVB y el análisis por GC-MS. Se llevó a cabo la identificación de compuestos de azufre utilizando el ion m/z 45 correspondiente al fragmento más estable de azufre metilado, mientras que para la identificación de compuestos volátiles de Se se utilizó el ion m/z 95, correspondiente al fragmento de Se metilado. Se identificaron ocho compuestos volátiles de azufre, los cuales presentaron mayor abundancia en el grupo control comparado con el grupo expuesto, siendo el dipropiltrisulfuro, 3, 5-dietil-1,2,4-tritriolano y

propilmercaptano, los que presentaron un mayor cambio (Razón de cambio > 4). En el caso de los metabolitos volátiles de Se, estos fueron identificados exclusivamente en el grupo expuesto los siguientes compuestos: dimetilselenio, metil alilselenio, dimetil selenosulfuro, dimetil diselenio, metil pentilselenio y propil selenosulfil metilo. Es notable la presencia de dos metabolitos selenosulfenatos, de los cuales el propil selenofulfenilmetilo se había reportado en hojas de *Allium fistulosum*, mientras que el dimetil selenosulfuro se ha reportado en plantas *Brassica juncea*, y en algas *Isochrysis galbana*, por lo que es importante el estudio de estos metabolitos en otro tipo de cultivos para establecer su función biológica en plantas estresadas con Se. Es importante resaltar la utilidad de la extracción de compuestos volátiles en productos alimenticios mediante SPME en headspace y su posterior identificación mediante GC-MS, pues se logró la identificación de un gran número de compuestos de azufre y Se. Otra ventaja importante es su utilidad en plantas de manera *in vivo*, lo cual reduce drásticamente algunos artefactos analíticos como la descomposición u oxidación de los metabolitos.

Otra vertiente del estudio metabolómico en cebolla consistió en la evaluación comparativa de metabolitos extraídos con etanol, de raíces expuestas a Se(IV) y controles, después de su derivatización con etilcloroformato (enfocado en aminoácidos y compuestos derivados de ellos). Las muestras se analizaron mediante GC-MS y mediante capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS. Además de los extractos de raíces, se analizó una mezcla comercial de estándares de aminoácidos, de los cuales se logró la confirmación de 16 aminoácidos mediante GC-MS, mientras que utilizando LC-MS se logró la confirmación de 13 aminoácidos utilizando sus fragmentos respectivos de MS/MS. Los datos obtenidos mediante GC-MS y LC-MS fueron analizados en la plataforma en línea XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) seleccionando las características moleculares que presentaban mayores diferencias en abundancia entre los dos grupos (Razón de cambio > 2, $p < 0.05$). Para facilitar la identificación de metabolitos de interés, se incorporó una lista de aductos que corresponde a la masa incorporada debido a la reacción de derivatización, la cual depende de la cantidad de grupos carboxilo y amino que presenta cada molécula. Dicha lista sirvió para la búsqueda de la masa molecular exacta que resulta de restar a la masa exacta del metabolito derivatizado, menos la contribución de masa por la derivatización. Los resultados obtenidos tanto por GC-MS como por LC-MS revelan un aumento de MeSeCys y de MeCys proporcional a la cantidad de Se(IV) a la cual se expusieron los cultivos. Por lo tanto, se planteó que ambos metabolitos provienen de rutas metabólicas similares o incluso de las mismas y por eso se planteó analizar diversas propuestas del metabolismo de estos compuestos. También se identificaron los metabolitos: ácido 2-selanilideneacético y el ácido 2-amino-2-sulfanil acético, de los cuales existe escasa información bibliográfica a la fecha e incluso hasta donde se sabe es la primera vez que se identifican estos compuestos en plantas de cebolla. Estos resultados son importantes en el campo de la foodómica puesto que la mayoría de los compuestos identificados en este trabajo se ha reportado que presentan funciones importantes en la quimiopreención. Además, se resalta la capacidad de los enfoques metabolómicos no dirigidos en productos alimenticios para identificar posibles compuestos que ayuden a esclarecer las rutas metabólicas involucradas para la captación de Se en plantas.

Por último, para avanzar en el entendimiento de la síntesis de MeSeCys y MeCys en raíces de cebolla, se realizaron experimentos *in vitro* preparando diversas mezclas de reacción, que contenían al menos dos de los siguientes tipos de reactivos: (i) sustrato aminoacídico, (ii) sustrato de Se o (iii) un cofactor (Capítulo 7). Después de una incubación, las mezclas fueron analizadas mediante ESI(+)-Q-TOF-

MS. Los experimentos de mayor relevancia fueron aquellos que involucraron la mezcla de ácido metilselenínico (AMSe), alanina y fosfato de piridoxal (PLP). Además de obtener los iones $[M+H]^+$ de los tres sustratos, se obtuvo una señal con m/z 199.9825 que presentó un patrón isotópico típico de Se. Se adquirió el espectro MS/MS del ion que se produjo de la reacción (m/z 199.9825), y con ayuda de los programas MetFrag y Metlin, fue identificado como MeSeCysO, con un error de masa $\Delta m/z = 2.5$ ppm, y una coincidencia de patrón isotópico $mSigma = 12.5$. La identificación de este metabolito es de gran relevancia, debido a que se demuestra que la síntesis de MeSeCys, MeSeCysO y MeCys requiere de alanina, PLP y la incorporación de una molécula de Se metilado. Debido a que AMSe es un análogo de metilselenol (CH_3SeH), la ruta que se propone en este proyecto de tesis es que el Se debe ser metilado para producir metilselenol, y posteriormente se incorpora con ayuda de PLP en la posición beta de la alanina, para producir MeSeCys. Este mecanismo alternativo del metabolismo de Se es importante debido a que actualmente el mecanismo más aceptado de síntesis de MeSeCys involucra la metilación directa de la SeCys.

Al final de cada uno de los capítulos, se presenta una sección breve de las conclusiones específicas, mientras que al final de la tesis (Capítulo 8) se presentan las conclusiones generales

Capítulo 1: Introducción

1.1. La posición de metales/metaloides en el dominio de las ciencias “omics”

Los sufijos “oma” y “ómica” derivan de la palabra genoma, término acuñado por Hans Winkler en 1920, aunque con anterioridad este término ya hacía referencia a un conjunto homogéneo de objetos que conformaban un todo [1]. El término “-oma” se refiere al estudio de los cambios totales o globales en el ADN o en los genes de los organismos (genoma), sus proteínas (proteoma), sus metabolitos (metaboloma), etc [2]. A pesar de que existen cuatro principales ciencias “ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica), existen muchas otras subdisciplinas “ómicas”, como lo son la epigenómica, lipidómica, interactómica, metalómica, foodómica, etc, las cuales han comenzado a emerger junto con sus propias herramientas, incluyendo una instrumentación, técnicas, reactivos, y programas informáticos [1].

1.2. Metabolómica

La metabolómica es una ciencia emergente definida como la determinación comprensiva y simultánea de metabolitos endógenos de baja masa molecular (< 1 000 Da) y sus cambios globales y dinámicos con respecto al tiempo y a las condiciones en las que se encuentra el organismo. Las tareas de la metabolómica abarcan el estudio de las rutas metabólicas y de sus modificaciones en consecuencia de un estrés ambiental, un estímulo biológico, manipulación genética, o una combinación de estas [3-5]. El término metaboloma fue introducido por Stephen G. Oliver en 1998 para abarcar la caracterización/determinación de un gran número de compuestos de distintas propiedades químicas que pueden encontrarse en un sistema biológico en un intervalo de concentraciones amplio y dinámico [6]. El reto principal de las herramientas y procedimientos en metabolómica es esta gran complejidad de compuestos y contextos, lo que obliga a formular precisamente el objetivo de estudio y emplear el diseño experimental que proporcione información analítica confiable y de relevancia biológica [3]. El papel de metales/metaloides en los organismos vivos ha sido estudiado en el contexto de metabolómica. En primer lugar, el análisis de las especies formadas durante metabolización de estos elementos forma parte de estudios metabolómicos de manera natural. Por otra parte, la presencia de metales/metaloides potencialmente afecta las rutas metabólicas del organismo provocando cambios en el perfil de metabolitos. En el caso de los metales/metaloides esenciales o benéficos estos efectos se asocian con sus concentraciones no fisiológicas (déficit o exceso), mientras que los llamados xenobióticos ejercen efectos adversos incluso en bajas concentraciones. Entre los efectos perjudiciales, hay que mencionar el estrés oxidativo en el cual se forman especies/radicales reactivos afectando una gran cantidad de biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos con daño en el metabolismo [7]. Como ejemplo de la complejidad de la relación entre los metales/metaloides y la metabolómica, se puede mencionar el manejo de estos elementos por las plantas. Su captación del suelo es regulada mediante procesos metabólicos; las plantas exudan compuestos orgánicos de baja masa molecular (típicamente ácidos) con el fin de solubilizar/acomplejar y así aumentar la biodisponibilidad de micronutrientes para satisfacer su requerimiento en procesos vitales. Así mismo, los metabolitos excretados ayudan en la sobrevivencia de los microorganismos que habitan en la rizósfera y contribuyen en el tráfico de nutrientes. Por otra parte, la actividad metabólica en plantas tiene un papel importante en el manejo de xenobióticos, mediante la disminución de su captación o mediante su neutralización/detoxificación en el interior de la planta [8, 9]. En particular, la exposición de la planta al estrés abiótico provocado por metales/metaloides activa mecanismos de defensa, entre

ellos el metabolismo secundario. Las herramientas y metodología de la metabolómica son necesarios para avanzar en el entendimiento de los mecanismos subyacentes.

1.3. Foodómica

La foodómica es otra disciplina de las ciencias, la cual se centra en el estudio de los alimentos y su bioactividad mediante herramientas de las ciencias ómicas. En este sentido, los enfoques de la foodómica abarcan: (i) el establecimiento de metodologías analíticas para garantizar la seguridad de los alimentos [10], (ii) el descubrimiento de biomarcadores que detecten productos inseguros, (iii) el avance en el conocimiento y en la comprensión del papel de compuestos nutricionales a nivel molecular, su interacción con genes, su efecto subsecuente en proteínas y metabolitos en los organismos expuestos, (iv) las bases para la producción de alimentos funcionales, (v) la detección de compuestos alergénicos, patógenos, toxinas, etc. [3, 11]

Actualmente existe una tendencia en las ciencias de los alimentos que ligan la comida con la salud, considerando a los alimentos no sólo como fuentes de energía, sino como medios confiables para prevenir futuras enfermedades [12]. En este contexto, tanto la proteómica como la metabolómica son plataformas analíticamente poderosas que permiten obtener información detallada acerca de la composición de los alimentos. El conocimiento de la composición bioquímica de los alimentos proporciona una mejor comprensión de las rutas metabólicas, permitiendo una visión más amplia de las bases moleculares en el comportamiento de diversas características como el sabor, color, textura, olor, nutrientes etc. [10]

El papel de los metales/metaloideos en la foodómica es muy importante; no solamente hay que prevenir la ingesta de los compuestos tóxicos, sino que también es necesario asegurar una adecuada cantidad y eficiente captación/utilización de los micronutrientes contenidos en los alimentos y también diseñar alimentos funcionales que por su contenido de especies biológicamente activas puedan contribuir en la prevención de ciertas enfermedades [13]. De esta manera, es de gran interés para la foodómica la determinación/especiación de metales/metaloideos en los alimentos, los estudios de su biodisponibilidad y de las transformaciones que ocurren en el organismo, y también los estudios de su interacción con otros componentes de los alimentos durante el proceso de digestión. Finalmente, cabe mencionar que los estudios de procedencia de los alimentos también contribuyen en el campo de foodómica, ya que tanto la composición como propiedades de los alimentos pueden depender de la región de su fabricación (materia prima y prácticas de los fabricantes).

1.4. Uso de espectrometría de masas en ciencias “omics”

La espectrometría de masas (MS) es un grupo de técnicas analíticas que miden la relación masa-carga (m/z) y abundancia de los iones, permitiendo la identificación/confirmación de especies químicas con base en su masa exacta, padrón isotópico y padrón de fragmentación; así como su cuantificación [14]. El proceso consta de tres pasos: 1) la conversión de moléculas en iones en fase gaseosa mediante una fuente de ionización; 2) la separación de los iones con base en su relación m/z en un adecuado separador de masas; 3) detección/cuantificación de los iones convirtiendo su flujo en la corriente eléctrica obteniendo señales proporcionales a la abundancia de cada una de las especies [15].

Las muestras reales casi siempre presentan una composición químicamente compleja y existe interés en obtener información sobre varios analitos, ambos aspectos de importancia en el contexto del impacto que la matriz química ejerce sobre la eficacia de ionización en MS. A pesar de la alta selectividad de estas técnicas, especialmente utilizando instrumentos de alta resolución, a menudo es necesario un pretratamiento de muestra para simplificar su composición y realizar la separación de compuestos acoplado a MS con técnicas tales como electroforesis capilar (CE), cromatografía de gases (GC) o cromatografía de líquidos (LC) [6].

El primer componente de un espectrómetro de masas es la fuente de ionización. Para la caracterización estructural y cuantificación de compuestos, se utilizan técnicas de ionización suave, en las cuales se emplea una baja cantidad de energía conservando la estructura inicial o logrando cierto grado de fragmentaciones. La electro-ionización (EI) utiliza corrientes de electrones energéticos durante el proceso de ionización y opera únicamente en condiciones de baja presión, mientras que los analitos son convertidos en fase gaseosa. Un filamento metálico es calentado, produciendo una corriente de electrones acelerados, dirigidos para colisionar con la muestra vaporizada, lo que provoca la expulsión de electrones y la subsecuente formación de cationes de los analitos en fase gaseosa. Estas condiciones no son adecuadas para moléculas grandes ni para matrices complejas. Los métodos de ionización química (CI) y desorción por plasma (PD), tienen la capacidad de formar iones de moléculas protonadas o iones con menor grado de fragmentación que los iones formados mediante EI [16]. En el método de CI, las moléculas neutras son colisionadas por electrones energéticos, produciendo iones cargados que interactúan con los analitos, produciendo especies con carga positiva. Tanto el método de EI como CI, tienen la capacidad de ionizar en un rango limitado de masas de $< 1\ 000$ Da. La ionización por desorción con plasma (PD) fue una de las ionizaciones “suaves” que se desarrollaron para poder analizar biomoléculas con masas moleculares muy grandes de hasta 100 kDa. Posteriormente se desarrollaron otros tipos de técnicas de ionización “suave” como bombardeo rápido de átomos (FAB), espectrometría de masas de ion líquido secundario (LSI-MS), ionización por electro-nebulización (ESI) y ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI). Mientras que EI y CI son típicamente empleadas en los acoplamientos GC-MS, por su naturaleza, ESI resulta adecuado en LC-MS mientras que MALDI sirve para el análisis directo de micromuestras sólidas o líquidas. Las dos últimas técnicas (ESI y MALDI) han permitido analizar macromoléculas biológicas como carbohidratos, lípidos, proteínas, nucleótidos, etc. [17]. En el ESI, durante la nebulización de la muestra, se aplica un potencial eléctrico muy grande en la salida de la aguja (1.5 – 4.5 kV), con lo cual se produce la formación de gotas altamente cargadas eléctricamente, las cuales posteriormente son vaporizadas mediante algún gas de secado neutro (por lo general N_2). Bajo estas condiciones, los compuestos polares y los iones presentes en las gotas del aerosol pasan en forma iónica al estado gaseoso [18]. Actualmente los mecanismos de formación de iones se han mejorado debido a tecnologías nanospray, las cuales son capaces de funcionar en flujos del orden de $nL\ min^{-1}$ [6].

Los iones se introducen a la parte del separador de masas. Existen diversos principios físicos utilizados para separar iones, como analizadores tradicionales tales como de sector del campo electrostático y/o magnético. Algunos de los más utilizados actualmente son los cuadrupolos (Q), cuadrupolo-trampa de iones (QIT), tiempo de vuelo (TOF) [14], y analizadores de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR). Las características más importantes de un analizador de masas están determinadas por varios parámetros como: la resolución (la eficacia de

separación de los iones, con base en su relación m/z); la exactitud de masa (nivel de confianza estadística en los valores m/z); el rango de masas en el que puede separar los iones; la adquisición MS/MS y su precisión (capacidad de reproducir una medición de masa de un compuesto dado) [18].

El cuadrupolo (Q) es un filtro de masas que consta de 4 barras metálicas alineadas paralelamente, de las cuales, 2 barras tienen directamente aplicado un voltaje, mientras que las 2 barras restantes están conectadas a un potencial alterno de radiofrecuencia [14, 19]. El voltaje que se aplica en las barras determina el vuelo de los iones a través del espacio central de las 4 barras, mientras que voltajes específicos de corriente directa y alterna propician que únicamente los iones con una cierta relación m/z pasen a través del analizador en un tiempo dado [15]. El espectro de masas es construido por la adquisición de los iones que pasaron a través del filtro cuadrupolar al haber variado los voltajes. Aunque es de funcionamiento simple y costo accesible, la limitación del cuadrupolo es que posee baja resolución, ya que permite separar iones con diferencia de m/z entre 0.3 y 1.0. El filtro de trampa de iones (IT) posee un diseño similar y capacidades similares al cuadrupolo; en este dispositivo los iones ingresan en un compartimento (trampa) donde son retenidos en el espacio entre 3 electrodos con forma hiperbólica, los cuales se encuentran como un anillo, y la cubierta de entrada y de salida del analizador. Este tipo de analizadores funciona al aplicar voltajes distintos en los electrodos que componen la trampa, de tal manera que se forma una cavidad en la que los iones son atrapados, y dicho voltaje determina la movilidad de los iones con una determinada relación m/z [2]. Después, los iones son enfocados en el detector mediante un cambio gradual de potencial provocando la adquisición del espectro de masas.

En los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) los iones positivos que provienen de la fuente de ionización son acelerados mediante un campo eléctrico pulsante de 10^3 a 10^4 V a la entrada de un tubo libre de campo y con un alto vacío. La separación de los iones en función de la masa se produce durante su recorrido hasta el detector, situado al final del tubo. Dado que todos los iones que entran en el tubo tienen la misma energía cinética, sus velocidades en él variarán inversamente a sus masas, y, por lo tanto, los más ligeros llegarán antes al detector que los más pesados [14].

El ciclotrón fue inventado en 1929 como un aparato de aceleración de partículas nucleares a velocidades muy grandes sin la necesidad de utilizar altos voltajes. En 1974 se combinó el funcionamiento de un ciclotrón a la transformada de Fourier (FT), permitiendo utilizar este diseño como un analizador de masas de alta resolución (FT-ICR) [6]. Un FT-ICR de alta resolución consta de una fuente de ionización ESI, un sistema que guía los iones hacia un campo magnético (la guía típicamente es un cuadrupolo) y una celda ICR o trampa tipo Penning. Una vez introducidos en la trampa, los iones son expuestos a un campo magnético lo que fuerza su movimiento con frecuencia angular inversamente proporcional a la m/z de los iones. La oscilación de cargas induce en los electrodos externos campos eléctricos con frecuencia característica para cada tipo de ion, obteniéndose la señal en forma de interferograma que se descompone a espectro de masas mediante la transformada de Fourier [20].

Uno de los equipos desarrollados más recientemente perteneciente a la familia de FT-MS es el separador de masa tipo "Orbitrap". Inventado por Alexander Makarov como una modificación a IT, en el que Orbitrap opera con un campo constante electrostático, mientras que IT utiliza un campo eléctrico dinámico con oscilaciones de ~ 1 MHz. Los espectrómetros de masas Orbitrap difieren de la mayoría de los FT-ICR en su mecanismo de excitación incorporado en la inyección [21].

En muchos equipos existe la posibilidad de realizar el modo MS tándem (MS/MS), en el cual el instrumento utiliza el primer separador de masas para seleccionar algún ion precursor con un valor m/z específico, que posteriormente es dirigido a una celda de colisión, en la que algún gas como Ar provoca la fragmentación de este ion [19]. Después de esto, los iones producidos por la fragmentación son analizados en un segundo separador de masas, con lo cual se logra obtener información precisa sobre las características estructurales del ion primario (precursor) [6, 22].

En el modo MS/MS se distinguen 4 tipos de escaneo mayormente utilizados:

- a) Escaneo del ion producto: en este modo, el primer separador de masas selecciona sólo un ion precursor de interés el cual es fragmentado en la celda de colisión produciendo los iones productos que en su totalidad son analizados en el segundo analizador de masas
- b) Escaneo del ion precursor: en este modo el segundo analizador se enfoca en un ion producto en particular posterior a la colisión, mientras que el primer analizador escanea la relación m/z .
- c) Escaneo de pérdidas neutras: el primer y el segundo separador de masas operan simultáneamente con una compensación de una masa “X”, la cual representa la masa de un fragmento neutro. Cuando un ion precursor es transportado a través del primer analizador, se registra si entre este ion o en alguno de sus iones producto existe una diferencia m/z de “X” posterior a la celda de colisión.
- d) Monitoreo de ion selectivo (SIM): en este modo, el primer y el segundo analizador de masas están enfocados en monitorear iones específicamente seleccionados. Con este modo se obtiene alta especificidad y sensibilidad teniendo en cuenta que se necesita de una gran dedicación en el análisis del monitoreo de las transiciones de interés. En este caso, la celda opera como guía de iones.
- e) Tanto el primer como en el segundo analizador de masas, se pueden ajustar para monitorear múltiples iones con la finalidad de analizar múltiples procesos de reacciones de fragmentación, técnica conocida como monitoreo de reacciones múltiples (MRM) y que es ampliamente utilizada para análisis cuantitativos de especies moleculares individuales empleando técnicas de acoplamiento de HPLC con MS.

Además de las técnicas tándem-en-el-espacio, existen también métodos denominados tándem-en-tiempo, en donde, de todos los iones, únicamente se fragmentan iones de un valor de m/z “en el mismo espacio”. Un separador usado con frecuencia en tándem-en-tiempo es el analizador IT (incluyendo los del tipo FT-ICR), mientras que los instrumentos de triple cuadrupolo (QqQ), los cuales constan de 3 cuadrupolos conectados, son utilizados comúnmente en espectrometría de masas tándem-en-el-espacio [18]. Las principales configuraciones de espectrómetros de masas con separadores híbridos son: QqQ, Q-IT, Q-TOF, Q-IMS-TOF, Q-orbitrap, Q-ICR, LIT-ICR, LIT-Orbitrap, TOF/TOF, IT-TOF, de los cuales el analizador ICR posee la mayor resolución y la mayor exactitud de masas, seguido de los separadores Orbitrap y TOF en comparación con todos los dispositivos actuales. Cabe resaltar, sin embargo, que los tiempos de adquisición aumentan para un mayor número de detección de iones. De todos los analizadores de masas, TOF posee las velocidades más altas de escaneo, además de que los intervalos de m/z son teóricamente ilimitados en configuraciones MALDI-TOF lineales (del rango de 100 000 Da) mientras que el rango m/z de analizadores TOF acoplados a sistemas de LC-MS es limitado a un rango de 10 kDa [15]. Los filtros de masa Q son los más simples y baratos, seguido de los IT. Los analizadores TOF son los más baratos de entre los analizadores de alta resolución, y con características importantes en términos de velocidad de adquisición e intervalo

de m/z . Los separadores con FT y ICR poseen los mejores parámetros, sin embargo, la complejidad instrumental con la que cuentan implica costos altos de inversión [6].

1.5. Espectrometría de masas

1.5.1. MS en estudios de metabolómica

El hecho de que los metabolitos no puedan deducirse simplemente de la información genética, como es el caso de los transcritos y las proteínas, crea un reto para el campo de la metabolómica. La metabolómica utiliza diversos procedimientos analíticos, en donde la etapa de tratamiento de muestra y la etapa de separación de compuestos preceden la caracterización y/o cuantificación de compuestos individuales por técnicas analíticas tales como MS, NMR, LIFD. De estas técnicas, la resonancia magnética nuclear (RMN) proporciona la identidad del compuesto de manera contundente, pero para el análisis se requiere mucha mayor cantidad y pureza de los compuesto respecto a los requerimientos de otras técnicas. Por su parte, la MS es la más versátil y la técnica más comúnmente utilizada en la caracterización estructural y en la cuantificación de metabolitos [2]. La versatilidad de la MS no solamente se sustenta en los diferentes dispositivos de ionización y separadores de masas disponibles, sino también en la facilidad de su acoplamiento con las técnicas de separación basadas en gran variedad de mecanismos y diseños comerciales disponibles. Tal como ya se presentó en apartados anteriores, en la separación se pueden emplear técnicas LC, CE y/o GC, cuyos eluyentes se introducen mediante una apropiada fuente de ionización a separadores de masa de alta y ultra-alta resolución (TOF, QTOF, TOF/TOF, FT-ICR, Orbitrap). Estas herramientas permiten la identificación de metabolitos con base en sus tiempos de retención (temperatura de ebullición, polaridad, carga iónica, etc.), masa exacta, padrón isotópico y espectros MS/MS o MSⁿ [3]. La MS es la tecnología más utilizada en metabolómica debido a su sensibilidad incomparable y especificidad, alta resolución y un amplio rango dinámico, permitiendo la cuantificación exhaustiva y medición cualitativa de grandes cantidades de metabolitos de baja masa molecular en muestras biológicas complejas [5].

Existen cuatro enfoques básicos para estudios metabolómicos: análisis dirigido (en inglés “targeted”), análisis no dirigido (en inglés “untargeted”), perfil metabólico y huella dactilar metabólica:

- Los análisis “no-dirigido” hacen referencia a los procesos en los cuales la máxima cobertura de los metabolitos analizados puede ser detectada simultáneamente en una matriz biológica compleja sin enfocarse en una tendencia particular de algún tipo de moléculas.
- El análisis “dirigido”, se enfoca en la identificación y/o determinación de metabolitos de una clase particular o de una ruta metabólica determinada [5].
- El enfoque de huella metabólica se refiere a la comparación de los perfiles de metabolitos que cambian en respuesta a alguna enfermedad, alguna alteración genética, del ambiente, o tratamiento farmacológico.
- Un perfil metabólico está representado por un análisis dirigido a moléculas específicamente seleccionadas, tales como biomarcadores de enfermedades, productos de reacciones enzimáticas, o metabolitos de una ruta metabólica específica. Debido al enorme avance tecnológico en espectrometría de masas en los últimos años, se ha logrado un aumento significativo en la cantidad de analitos que pueden ser cuantificados en estos análisis [6].

Tal como ya se mencionó anteriormente, debido a la multitud de compuestos contenidos en muestras analizadas (como orina, plasma, saliva, células, tejidos, etc.), su análisis requiere de una etapa previa de purificación y/o extracción/pre-concentración de compuestos de interés. Se utilizan para ello diversas modalidades de extracción líquido-líquido o sólido-líquido, preferentemente en escala micro, empleando en cuanto sea posible, un adecuado estándar interno. Por su parte, la etapa de análisis de datos es muy importante en la metabolómica, siendo la identificación de todos los compuestos un reto inalcanzable en la mayoría de los casos. En el análisis de huellas o perfiles metabólicos, los datos crudos se procesan empleando diferentes tipos de herramientas de software. En particular, cabe mencionar el uso de métodos estadísticos (análisis de componentes principales PCA, prueba t y gráfica de volcano) que permiten comparar los perfiles de elución entre diferentes muestras obteniéndose un número reducido de señales/compuestos cuya identidad y/o contenido son diferentes en el mismo sistema biológico bajo diferentes condiciones. En la etapa posterior del análisis, se busca la identidad de los compuestos pre-seleccionados [6]. Debido a la enorme cantidad de metabolitos en sistemas biológicos, muchos de ellos desconocidos, la tarea final de identificación es especialmente difícil. Incluso aceptando el error de masa exacta inferior a 1 ppm, para la misma composición elemental existen muchos compuestos que cumplen con los criterios de búsqueda. Es por ello que la confirmación se puede lograr solamente aislando el compuesto de interés y sometiendo al análisis por NMR; o sintetizando el compuesto pre-identificado y confirmando su presencia en la muestra analizada mediante el experimento de adición de estándar. Puesto que metabolitos (sobre todo secundarios) se presentan en muy bajas concentraciones, el aislamiento de una cantidad suficiente para este análisis es un reto adicional. Para la identificación de compuestos, existen diferentes bases de datos o bibliotecas de espectros. Entre ellas, tal vez las más versátiles son la HMDB (human metabolite database, www.hmdb.ca/) que contiene más de 10 000 compuestos junto con sus espectros obtenidos por LC-MS, GC-MS y NMR; y la base METLIN con espectros LC-MS de 13 000 compuestos (<http://metlin.scripps.edu/>). Adicionalmente, se han desarrollado diferentes plataformas para el análisis de datos que permiten la identificación más eficiente utilizando algoritmos heurísticos basados en las huellas isotópicas, composición elemental, padrones de fragmentación bajo diferentes condiciones empleadas en la zona CID, etc.

Dentro de los estudios metabolómicos hay que mencionar la técnica de imagen por espectrometría de masas MS-I o I-MS que permite análisis moleculares de tejidos al tiempo que la información se asigna a una distribución espacial de estos metabolitos a lo largo de la superficie o corte del tejido. La extracción tradicional de tejidos utilizada para proteómica y metabolómica no incorpora esta información espacial, aunque la extracción líquida sigue siendo ampliamente utilizada en estudios a gran escala porque MS-I es de un relativo alto consumo de tiempo y menos reproducible al analizar una gran cantidad de muestras. Algunas otras técnicas que permiten la visualización de macromoléculas en estructuras celulares requieren un claro conocimiento de los analitos de interés y requiere enfocarse en moléculas específicas, como proteínas. Existen cuatro tipos de desorción/ionización para llevar a cabo I-MS: MALDI, espectrometría de ion secundario (SIMS), desorción por electrospray (DESI) y ionización por ablación láser de electrospray (LAESI), siendo MALDI el más ampliamente utilizado para este campo [2, 10].

En el caso de los metales/metaloides, los estudios metabolómicos abarcan aquellos donde se busca el impacto del(los) elemento(s) sobre el perfil metabólico de un organismo, utilizando principalmente enfoques de huellas o perfiles metabólicos. Por otro lado, los estudios de las transformaciones y rutas

de metabolización de los elementos también pertenecen al dominio de la metabolómica. En el caso de compuestos conocidos, se desarrollan nuevos procedimientos o se adoptan aquellos ya establecidos para el análisis de especiación. Se utilizan entonces diversas técnicas de fraccionamiento y separación junto con la espectrometría atómica en la etapa de detección/cuantificación. En la búsqueda de nuevos metabolitos, se emplean procedimientos típicos de metabolómica; sin embargo, la detección de compuestos que contienen átomos de hetero-elementos es facilitada debido a su padrón isotópico único (excepto elementos mono-isotópicos como As, S, P, entre otros).

En este proyecto de tesis, se propone llevar a cabo dos estudios metabolómicos; uno de ellos enfocado a cambios del perfil metabolómico en raíces de cebolla bajo exposición a Se(IV). El análisis comparativo de los perfiles metabólicos entre plantas expuestas y controles permitirá avanzar en el conocimiento sobre el impacto de Se(IV) en los organismos vivos y en particular, sobre los mecanismos responsables de citotoxicidad de Se, un aspecto muy importante para entender el papel de este elemento en quimioprevención. Así mismo, se discutirá el impacto de Se en el contexto del valor nutricional de las plantas. El segundo será centrado en cambios a nivel de metaboloma asociados con síndrome metabólico en humanos. El objetivo en este caso es la búsqueda de potenciales biomarcadores de este estado clínico de pacientes.

1.5.2.MS en estudios de foodómica

Debido a la variedad de objetivos existentes en el área de foodómica y la composición químicamente compleja de las muestras, se utilizan técnicas y procedimientos avanzados basados en diferentes principios fisicoquímicos [11].

Las herramientas utilizadas en los enfoques de foodómica se agrupan de manera siguiente:

- Preparativas: extracción en fase sólida (SPE), extracción con fluido supercrítico (SFE), extracción/sorción en “headspace” (HS), micro-extracciones liquido-liquido, extracción asistida por microondas (MAE), con agitación por ultrasonido, a presión elevada; todas ellas en diferentes modalidades o combinaciones.
- Separativas: HPLC, CE, cromatografía con fluido supercrítico (SFC)
- Espectrométricas: Espectrometrías moleculares (MS, NMR, IR, fluorimetría, etc.) y espectrometrías atómicas (FAAS, ETA-AAS, ICP-OES, AFS, ICP-MS, etc.)
- Biológicas: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnicas inmunológicas, uso de biosensores
- Radioquímicas
- Electroquímicas
- Híbridas.

La selección del procedimiento depende obviamente de los objetivos específicos que por lo general son más amplios en foodómica que en otras áreas. En el caso de compuestos conocidos tales como residuos de pesticidas, fármacos, especies de metales/metaloides, compuestos con actividad biológica, existen procedimientos establecidos en los cuales se utilizan estándares auténticos para confirmar identidad y cuantificar los analitos. Por otro lado, durante el crecimiento de los cultivos, obtención de productos transgénicos, el procesamiento de materia prima y elaboración de alimentos

(como fermentación, cocción, etc.) o de almacenaje/conservación (congelamiento, secado, etc.) ocurren cambios a nivel de proteoma y metaboloma. Cuando el objetivo es contribuir en el conocimiento de ciencias de cultivos, calidad de materia prima, almacenaje de alimentos, vida de anaquel y procesamientos post-cosecha, el estudio foodómico incluye enfoques proteómico y metabolómico. Es por esto que en foodómica se utilizan las herramientas de las ciencias ómicas (proteómica y metabolómica). Estas herramientas son recomendadas por la EFSA (European Food Safety Authority) para detectar, determinar composición, etapas de producción, realizar estudios de modificaciones involuntarias y cuestiones de clasificación de alimentos modificados genéticamente [10].

El control de potenciales contaminantes y agentes tóxicos en productos alimenticios también pertenece al área de foodómica. En este contexto, una de las partes del proyecto de tesis se centró en la determinación y especiación analítica del arsénico en tortilla mexicana. En continuación de la tesis de maestría, se afinó el procedimiento propuesto para la determinación de As por MP-AES utilizando Te(IV) como estándar interno y generación de hidruros para la introducción de la muestra al plasma. Así mismo, se exploró el potencial de la SPE en la determinación selectiva del iAs utilizando el mismo procedimiento. Como otro aspecto foodómico del proyecto, se propuso estudiar si los niveles de metales mayoritarios y traza en vinos podrían ser útiles en la evaluación de procedencia de los vinos mexicanos. Para ello, la contribución original consistió en poner a punto el procedimiento analítico basado en el uso de espectrometría de emisión atómica con excitación en plasma de microondas (MP-AES).

2. Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo ha sido contribuir en el desarrollo metodológico en el análisis de matrices químicamente complejas, enfocándose en metales/metaloides y en aplicaciones relacionadas con metabolómica y foodómica. Enfoque metabolómico: Evaluación comparativa de perfiles metabolómicos adquiridos mediante el análisis capHPLC-ESI-QTOF-MS de orinas de pacientes con síndrome metabólico (SM) y controles sanos, en búsqueda de potenciales marcadores de SM.

Enfoque foodómico: Aplicación del sistema MP-AES en el análisis de metales/metaloides en tortillas y vinos mexicanos.

Enfoque metabolómico y foodómico: (i) estudio bibliográfico de los avances en los análisis metabolómicos en plantas expuestas a selenio; (ii) estudio del impacto de Se(IV) sobre perfil metabolómico de las raíces de cebolla.

3. Capítulo 3: Análisis metabolómico diferencial en orinas de pacientes con síndrome metabolómico

Hay muchos tipos de enfermedades crónicas, incluyendo la diabetes, el cáncer, SIDA, artritis y muchos más. Aunque se han logrado grandes avances en el desarrollo de tratamientos farmacológicos, una gran parte de la población mundial sigue enfrentando un desafío a su salud mental y emocional, debido a que las enfermedades crónicas pueden ser permanentes y empeorar gradualmente. Además, las enfermedades crónicas fuerzan muchos cambios en el estilo de vida potencialmente estresantes como dejar de hacer actividades, adaptarse a nuevas limitaciones físicas y pagar medicaciones y tratamientos costosos [23]. Las enfermedades cardíacas, los infartos, el cáncer, las enfermedades respiratorias y la diabetes, son las principales causas de mortalidad en el mundo, siendo responsables del 63% de las muertes. En el año 2016, murieron 17.8 millones de personas a nivel mundial debido a enfermedades cardiovasculares, y se estima que en el 2045 habrá 700 millones de personas alrededor del mundo que padecerán algún tipo de diabetes [24].

Además del tratamiento de las enfermedades crónicas, una línea de investigación y de acción importante es la prevención de las mismas. Es por ello que se buscan biomarcadores que alerten sobre el riesgo o estado temprano de la enfermedad aumentando posibilidades para su prevención. En este sentido, los estudios metabolómicos son de gran ayuda; no solamente permiten encontrar los compuestos asociados con etapas tempranas de la enfermedad, sino que también proporcionan información necesaria para avanzar en el conocimiento de los mecanismos subyacentes de las patologías.

3.1. Síndrome metabolómico

3.1.1. Descripción del Síndrome Metabolómico

El Síndrome Metabolómico (SM) se define como un conjunto extenso de factores que aumentan el riesgo de padecer enfermedades como diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas, cáncer y enfermedades neuro-degenerativas [25]. Otras afecciones que pueden sufrir las personas con SM son hígado graso, cálculos biliares de colesterol, gota y apnea del sueño, las cuales pueden complicar el estado de salud [26].

Las enfermedades cardiovasculares que presentan riesgo de desarrollar los pacientes con SM incluyen afecciones del corazón y de los vasos sanguíneos, relacionado principalmente con la grasa y el colesterol que se acumulan en las vías sanguíneas, y entre las cuales se encuentran cardiopatía coronaria en el que la acumulación de colesterol provoca que las arterias se estrechen y el corazón no reciba suficiente sangre ni oxígeno; insuficiencia cardíaca, en la cual el miocardio se vuelve rígido o débil y le es complicado bombear sangre oxigenada [27]; arritmias cardíacas; enfermedades de las válvulas cardíacas en las que durante el latido, la sangre se escapa a través de la válvula, dirigiéndose en una dirección equivocada, o cuando una válvula no se abre lo suficiente y bloquea el flujo sanguíneo [28]; todos estos padecimientos pueden provocar un ataque fulminante, un fallo al miocardio o un accidente cerebrovascular los cuales son importantes causas de muerte a nivel mundial así como la diabetes [29], lo que significa que el SM es un tema de gran importancia para la salud a nivel mundial.

3.1.2. Factores de riesgo y diagnóstico del Síndrome Metabólico

Los factores de riesgo que definen al SM son condiciones interrelacionadas fisiológica, bioquímica, clínica y metabólicamente y abarcan obesidad, hipertensión arterial, esteatosis hepática, hiperglicemia, estado protrombótico, estado proinflamatorio, disglucemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, niveles altos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y niveles bajos de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL) [26, 30, 31].

Debido a esta “constelación” tan amplia y variada de factores que describen la afección de SM, por mucho tiempo se intentó establecer una forma sencilla para poder diagnosticarlo, por lo que en 1998 la OMS propuso un conjunto de criterios para el diagnóstico clínico del SM, los cuales incluían evidencia clínica de resistencia a la insulina, como intolerancia a la glucosa, o diabetes tipo 2. También se requería de otros dos factores de riesgo: triglicéridos altos o bajos niveles de HDL, presión venosa sanguínea elevada, obesidad o microalbuminuria [32]. En el 2003, el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol y el Panel para el Tratamiento del Adulto 3 (NCEP-ATP III) simplificó los criterios de la OMS, estableciendo que para poder diagnosticar SM era necesaria la presencia de 3 de 5 simples mediciones clínicas, las cuales son: aumento de la circunferencia de la cintura, triglicéridos elevados, bajos niveles de colesterol HDL, presión venosa sanguínea elevada o altos niveles de glucosa. La obesidad no fue incluida debido a que ciertas personas con resistencia a la insulina pueden tener múltiples anomalías metabólicas sin presentar una obesidad abdominal evidente [26].

La Asociación Cardíaca Americana (American Heart Association) y el Instituto Nacional del Corazón, Pulmones y Sangre (National Heart, Lung and Blood Institute) adoptaron los criterios utilizados por la ATP III con ligeras modificaciones, además de que la Federación Internacional de Diabetes (IDF) reemplazó los criterios establecidos por la OMS para adoptar los propuestos por la ATP III, proponiendo que el parámetro de la obesidad abdominal se ajustara para cada etnia en particular. Esto simplifica los diagnósticos en países en vías de desarrollo para disminuir costos y recursos, además de armonizar el criterio de diagnóstico para SM.

3.1.3. Causas del Síndrome Metabólico

Algunos factores que afectan el riesgo de padecer SM incluyen edad, sexo, etnia, estatus socioeconómico, estatus de fumador [32], disfunción endócrina, y anomalías genéticas, además, el aumento en la incidencia del SM a nivel mundial parece estar influenciado en gran parte por la obesidad derivada de estilos de vida sedentarios [26]. Algunos grupos de población tienen mayor predisposición a desarrollar obesidad y resistencia a la insulina, como los indios americanos “pima”, y grupos hispanos, pues se cree que poseen un grupo de genes que actúan para producir el SM, desencadenado por un ambiente propicio como lo sería una dieta alta en grasas y una baja actividad en cuanto a hábitos de ejercicio, a diferencia de las poblaciones asiáticas, que tienen menos incidencia en cuanto a niveles de obesidad [25]. Se sabe que, por ejemplo, la resistencia a la insulina tiene un carácter poligenético heterogéneo, sin embargo, a pesar de que es sabido que tanto factores genéticos como ambientales juegan un papel importante en las implicaciones relacionadas con el SM, todavía no está claro cómo interactúan este conjunto de factores para incidir en el desarrollo del SM.

El SM puede ser desarrollado durante la infancia, por lo que tiene una estrecha relación con la prevalencia de sobrepeso en los niños. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud, en México, el

10 % de los jóvenes y adolescentes padecen SM, y aproximadamente el 40 % de los mexicanos presentan este trastorno [33, 34]. Por otro lado, se estima que una cuarta parte de la población mundial adulta padece de SM. [31].

3.1.4. Avances en estudios metabolómicos del Síndrome Metabólico

A pesar de los diagnósticos clínicos establecidos para determinar el SM, una definición molecular del SM podría ofrecer ventajas con respecto a definiciones fenotípicas, facilitando la predicción y detección de estados tempranos. Esto a su vez ayudaría a estratificar poblaciones con base en su riesgo, tomar medidas terapéuticas y disminuir el riesgo de desarrollar afecciones, etc. Para este fin se requieren de herramientas con enfoques “ómicos” que tengan la capacidad de integrar la determinación de factores múltiples determinando el fenotipo metabólico dentro de un complejo multifactorial como lo es el SM. Los análisis de perfiles metabolómicos abren un gran campo utilizado para identificar características específicas del SM y de esta forma identificar biomarcadores intrínsecos de la enfermedad [32].

Los avances logrados en el campo de la metabolómica permiten adquirir perfiles de metabolitos de organismos completos, y permite encontrar moléculas que pudieran ser sustratos o productos de rutas metabólicas. NMR y MS son las tecnologías metabolómicas de mayor relevancia, aunque hoy en día, el acoplamiento LC-MS permite detectar un mayor número de compuestos con buena reproducibilidad y sensibilidad, además de tener la ventaja de poder confirmar los metabolitos mediante un análisis MS/MS. La metabolómica basada en LC-MS ha sido ampliamente aplicada en diagnósticos, estadísticas, tratamiento e investigación de biomarcadores y mecanismos patofisiológicos de una gran variedad de enfermedades. Muchos análisis metabolómicos del SM fueron realizados con LC-MS, los cuales muestran una expresión metabólica significativamente alterada, además de descubrir varios marcadores de importancia biológica en pacientes con SM en comparación con individuos sanos [35].

Algunos indicadores de la resistencia a la insulina y de la inflamación, como lo son la adiponectina, la leptina y la proteína C-reactiva, han sido propuestos como biomarcadores del SM. No obstante, el SM es un desorden metabólico que implica múltiples rutas metabólicas; por ello, muchos de los parámetros clínicos más simples no reflejan del todo el estatus fisiológico y no pueden explicar las posibles rutas subyacentes a fenotipos complejos [35]. Los análisis metabolómicos en el tema de SM siguen siendo escasos, aunque este campo es importante en el avance de la investigación de este padecimiento. En la Tabla 1.1 se resumen algunos trabajos encontrados en la bibliografía, destacando que la mayoría de ellos se enfocan en enfermedades particulares que se desarrollan por el SM.

El objetivo de esta parte del proyecto fue realizar un estudio metabolómico no dirigido, buscando cambios en perfiles metabolómicos en orinas de pacientes con SM respecto al grupo control sano y de esta manera contribuir en el descubrimiento de biomarcadores potenciales. Se decidió analizar orina debido a su toma de muestra no-invasiva, alto volumen disponible, composición química relativamente sencilla (comparando con muestras de sangre o suero) y considerando que la orina es una buena fuente de metabolitos. Como herramienta analítica se seleccionó cromatografía de líquidos capilar en fase inversa acoplada con espectrometría de masas de alta resolución (capHPLC-ESI-Q-TOF-MS).

Tabla 1. 1: Algunos ejemplos de estudios metabolómicos no dirigidos, realizados a distintas muestras para pacientes con afecciones de SM o diabetes.

Enfermedad	Muestras	Técnicas analíticas	Software para análisis de datos	Tratamiento estadístico	Resultados	Referencia
Síndrome Metabólico	Suero	capHPLC-Q-TOF-MS; GC-MS	MZmine, SPSS, R	Test-t, prueba de Wilcoxon	Se analizaron sujetos con SM, y se hicieron dos grupos con dietas distintas: avena/pan de trigo/patatas; pan de centeno/pasta. Esta dieta modificó el perfil metabólico del suero sobre todo en especies lisoPC, contribuyendo a procesos proinflamatorios que promueven cambios adversos en el metabolismo de la glucosa y de la insulina.	[36]
Diabetes	Orina	¹ H-NMR	SIMCA-P+ 10.0	Análisis univariante y multivariante, escala de Pareto, PCA, mínimos cuadrados parciales	Se compararon perfiles metabolómicos de humanos y ratones, demostrando similitudes en términos de estrés sistemático, cambios en el ciclo de los ácidos TCA y perturbaciones en el metabolismo de nucleótidos.	[37]
Síndrome metabólico	Orina	HPLC-Q-TOF-MS; LC-ESI-LTQ-Orbitrap-FTMS	SIMCA-P+ 11.5	PCA, HCA con correlación Pearson	Se compararon pacientes con y sin una dieta que incluyó nueces. Se establecieron marcadores de consumo de nueces (ácidos grasos conjugados, metabolitos fenólicos), y se confirmó la biodisposición y bioactividad del metabolismo de polifenoles de nuez en efectos a la salud.	[38]

Tabla 1.1 (Continuación): Algunos ejemplos de estudios metabolómicos no dirigidos, realizados a distintas muestras para pacientes con afecciones de SM o diabetes.

Enfermedad	Muestras	Técnicas analíticas	Software para análisis de datos	Tratamiento estadístico	Resultados	Referencia
Diabetes	Orina	GC-MS; LC-ESI-TQMS	(SIMCA)-P, OPLS-DA	Test-t, test Mann-Whitney, PCA, LASSO	Se comparó el perfil metabólico de orinas de pacientes con diabetes comparando los que tienen normal o bajo índice de filtración glomerular (GFR), y como resultado, el octanol, ácido oxálico, ácido fosfórico, benzamida, creatinina, 3,5-dimetoximandélica amida y N-acetilglutamina fueron asociados con un bajo GFR.	[39]
Diabetes	Suero	GC-MS; LC-ESI-TQMS	(SIMCA)-P	ANOVA, Test-t, test Mann-Whitney, PCA, LASSO, OPLS-DA	Se compararon individuos sanos y con diabéticos (glucemia en ayunas alterada); aquellos con diabetes presentaron un nivel mayor de fructosa, α -hidroxibutirato, alanina, prolina, fenilalanina, glutamina, aminoácidos de cadena ramificada, lípidos (ácido mirístico, palmítico y esteárico), y una disminución de ácido piroglutámico, glicerofosfolípidos y esfingomielinas.	[40]
Diabetes	Suero	LC-ESI-TQ-ITMS	SIMCA-P software	PCA, PLS-DA	Se determinó el perfil de metabolitos fosfolipídicos en sueros de individuos sanos y con diabetes, pudiéndose encontrar diferencias entre ambos grupos e identificar biomarcadores de este tipo de metabolitos relacionados con la diabetes.	[41]

Tabla 1.1 (Continuación): Algunos ejemplos de estudios metabolómicos no dirigidos, realizados a distintas muestras para pacientes con afecciones de SM o diabetes.

Enfermedad	Muestras	Técnicas analíticas	Software para análisis de datos	Tratamiento estadístico	Resultados	Referencia
Diabetes	Suero	NMR, capHPLC-MS, GC-MS	System R	Test Kendall sin parámetros	Se obtuvieron biomarcadores conocidos en suero de diabéticos (1,5-anhidroglucoitol, cuerpos cetónicos como 3-hidroxibutirato, y cadenas de aminoácidos ramificadas), detectándose también compuestos relacionados con medicación para diabetes (pioglitazona o ácido salicílico). Comparando con individuos sanos, se observaron perturbaciones en rutas metabólicas relacionadas a disfunción de los riñones, en metabolismo de lípidos e interacciones con la microflora intestinal.	[42]
Diabetes	Suero	FI-TQMS		Modelo de riesgo proporcional (Cox), PCA, correlación parcial Spearman.	Realizaron un estudio metabolómico dirigido en suero de diabéticos, se relacionó la presencia de hexosa, fenilalanina, diacilfosfatidilcolinas con el aumento de riesgo de diabetes y se atribuyó la presencia de glicina, esfingomielina C16:1, acil-alquil-fosfatidilcolina C18:2 con la disminución de riesgo de diabetes.	[43]

UPLC-Q-TOF-MS: cromatografía de líquidos de ultra resolución acoplado a espectrómetro de masas por cuadrupolo-tiempo de vuelo. GC-MS: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. SM: Síndrome metabólico. ¹H-NMR: resonancia magnética nuclear de protón. PCA: análisis de componentes principales. ESI-LTQ: ionización por electronebulización con detector triple cuadrupolo lineal. FTMS: Espectrometría de masas por transformada de Fourier. IT-MS: Espectrómetro de masas con separador por trampa iónica. TCA: ácidos tricarbónicos. GFR: índice de filtración glomerular. HCA: análisis jerárquico de agrupaciones. OPLS-DA: análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales. LASSO: regresión logística de mínimos absolutos contraídos.

3.2. Objetivos

El objetivo de esta parte del trabajo consistió en identificar compuestos que diferencien estadísticamente los perfiles metabolómicos de pacientes con SM con respecto a un grupo control sano.

3.2.1. Objetivos específicos:

- Discriminar las muestras de los individuos con respecto a 23 parámetros antropométricos clínicos para analizar las orinas de aquellos con mayor variabilidad en un modelo de análisis de componentes principales.
- Analizar las muestras de orina de ambos grupos mediante capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS y analizar los resultados para evaluar estadísticamente las diferencias entre ambos grupos.
- Identificar los compuestos con más influencia en la diferenciación entre ambos grupos.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Equipos analíticos y softwares utilizados

Se utilizó un cromatógrafo modelo Ultimate 3000 RLSCnano system (Dionex Thermo Scientific) equipado con una bomba binaria, un termostato en el compartimento de la columna y un automuestreador, el cual fue acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución con sistema de ionización por electro-nebulización y analizador de masas cuadrupolo - tiempo de vuelo ESI-Q-TOF-MS modelo maXis Impact (Bruker Daltonics). Al realizar este acoplamiento (capHPLC-ESI-Q-TOF-MS) es necesario controlar este sistema mediante el programa Hystar 3.2 LC-MS (Bruker Daltonics), el cual permite operar un sistema cromatográfico. Se utilizó una trampa capilar (Agilent 5 x 0.3 mm, C18, 5 μm) y una columna cromatográfica capilar de fase inversa Halo C18 (150 x 0.3 mm, 2.7 μm) con conexiones capilares nanoViper (d.i. 50 μm). El procesamiento de datos se realizó mediante el programa DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics). Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software MetaboScape 3.0 (Bruker Daltonics) además de realizar la asignación de tiempos de retención, masa exacta, patrón isotópico, y espectro de fragmentación de ion precursor.

Se utilizó además un cromatógrafo de líquidos de alta resolución utilizando los módulos de detección por arreglo de diodos y de fluorescencia Agilent 1200, equipado con un automuestreador, termostato y una bomba cuaternaria controlados por el software Chemstation. Se utilizó una columna cromatográfica Hypersil C18 (125 x 40 mm, 3 μm).

3.3.2. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado reactivo. Se utilizó agua desionizada (18.2 M Ω cm, Labconco E.U.A.), y metanol y acetonitrilo grado HPLC (Fischer Scientific, Pittsburgh, E.U.A.). Se utilizaron los siguientes reactivos de grado analítico de sigma: metanol, ácido fórmico, acetonitrilo, ácido trifluoroacético, ácido fosfórico, formiato de amonio, hidróxido de sodio.

Se utilizaron cartuchos Supelco HLB con capacidad de 3 mL y con 100 mg de fase sólida.

3.3.3. Descripción de muestras y parámetros para selección de muestras a analizar

Se reclutaron 100 pacientes con SM y 80 pacientes sanos de diferentes centros de salud pertenecientes a la Secretaría de Salud del Estado de Guanajuato y de diferentes empresas, todos ubicados en la ciudad de León Gto., México, para posteriormente ser canalizados a las instalaciones del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato, Campus León, Gto. El Comité Institucional de Bioética en la Investigación de la Universidad de Guanajuato (CIBIUG) aprobó el protocolo, y se obtuvieron las firmas de consentimiento de las personas participantes. Se evaluaron 23 parámetros clínicos y antropométricos utilizando procedimientos de rutina: 1-Nivel de glucosa en ayuno, 2-colesterol, 3-HDL-C, 4-LDL-C, 5-VLDL-C, 6-índice aterogénico de plasma, 7-triglicéridos (TG), 8- TG/HDL-C, 9-prueba de hemoglobina glicosilada (HbA1c), 10-presión sistólica sanguínea, 11-presión diastólica sanguínea, 12-estatura, 13-peso, 14-porcentaje de grasa corporal, 15-porcentaje de masa muscular, 16-porcentaje de masa ósea, 17-índice de masa corporal (IMC), 18-consumo de kcal al día, 19-agua corporal, 20-edad metabólica, 21-grasa visceral, 22-diámetro de cintura, 23-porcentaje de la parte superior corporal. Con base en los parámetros medidos en 180 participantes, se diagnosticaron 52 personas con SM y se seleccionaron 50 personas sanas como grupo control. Utilizando un análisis de componentes principales (PCA) de los parámetros anteriores en 102 participantes seleccionados, se obtuvo un modelo para elegir los pacientes con mayor varianza, obteniendo finalmente 5 pacientes femeninos con SM, 6 pacientes masculinos con SM, 5 pacientes masculinos sanos y 8 pacientes femeninos sanos.

De estos 24 pacientes se colectó ambulatoriamente la primera orina de la mañana, transportada en hielo al laboratorio y las alícuotas fueron congeladas a -20 °C para preservar hasta el análisis. Luego de ser descongeladas las alícuotas, se tomaron 20 µL, se añadieron 80 µL de metanol y se centrifugaron durante 10 min a 10 000 g. Un volumen de 25 µL del sobrenadante fue diluido y acidificado con ácido fórmico 0.1 % para posteriormente llevar a cabo el análisis mediante LC-HR-MS.

3.3.4. Análisis metabólico de orinas mediante capHPLC-Q-TOF-MS

De las alícuotas procesadas, diluidas y acidificadas en ácido fórmico 0.1 %, se inyectaron 10 µL (automuestreador mantenido a una temperatura de 10 °C) por duplicado de cada muestra en el sistema capHPLC-Q-TOF-MS. Las dos fases móviles fueron: (A) 0.1 % de ácido fórmico acuoso y (B) ácido fórmico 0.1 % en acetonitrilo, para ingresar cada alícuota en una trampa capilar C18, utilizando un flujo de 15 µL min⁻¹ con 10 % B. En esta etapa, se removieron compuestos iónicos y polares, reteniendo los metabolitos de interés en la trampa. Posterior a 2 min de estas condiciones, se procedió a eluir los compuestos preconcentrados en la trampa e introducirlos a la columna capilar Halo C18 mantenida a 40 °C, llevando a cabo la separación a un flujo de 4 µL min⁻¹ con el programa de elución mostrado en la Tabla 1.2. La salida de la columna fue conectada a la fuente de ionización ESI, operada en modo positivo con los parámetros descritos en la Tabla 1.2.

Tabla 1. 2: Parámetros utilizados para el análisis de muestras de orinas mediante cromatografía de líquidos en escala capilar y espectrometría de masas de alta resolución (capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS)

Parámetros de HPLC		Valor
Columna	Halo C18 (0.3 x 150 mm, 2.7 μm)	
Programa de elución	Tiempo (min)	(B) Ác.fórm 0.1 % en ACN
	0-38	20%-98%
	38-42	98 %
	42-45	20 %
Temperatura	40 °C	
Flujo	4 $\mu\text{L min}^{-1}$	
Volumen inyectado	10 μL	
Parámetros de ESI-Q-TOF-MS		Valor
Modo ESI	Positivo	
Voltaje de ionización	4 500 V	
Flujo de gas de secado (N_2)	4.0 L min^{-1}	
Temperatura de secado	180 °C	
Presión de gas de nebulización	0.4 bar	
Intervalo de masas adquirido	m/z 50 – 1250	
Adquisición de MS/MS	Automático	
Velocidad de adquisición MS/MS	2 Hz (Intensidad < 40 000)	
	5 Hz (Intensidad > 40 000)	
Calibración de masa fija	Estearato de metilo (299. 2945 m/z)	

Los resultados obtenidos fueron procesados utilizando Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics), realizando la recalibración de la masa exacta, y la sustracción de fondo. El procesamiento posterior de datos fue realizado en MetaboScape 3.0 (Bruker Daltonics), siguiendo el flujo de trabajo definido en el modo “T-REX 2D/3D” para obtener de manera automática las características moleculares, sus respectivos tiempos de retención, la masa exacta, el patrón isotópico y el espectro de fragmentación del ion precursor (MS/MS). Para la selección de compuestos que presentaban mayores diferencias de abundancia entre dos grupos (SM y sanos), se realizó un análisis t-student y se obtuvo un gráfico vulcano, de tal manera que las características moleculares con un aumento comparativo de señales en

el grupo con SM respecto del grupo control (Razón de cambio) > 3 y a un valor de significancia $p < 0.05$ fueron elegidas para su posterior identificación. La herramienta “Smart Formula” fue utilizada para obtener la composición elemental, utilizando la masa exacta y patrón isotópico de cada compuesto. Los programas Compound Crawler y MetFrag fueron utilizados para elucidar la estructura molecular, basado en la comparación de los espectros de fragmentación con aquellos guardados en las bases de datos, y la concordancia de valores m/z con los valores de compuestos incluidos en las sub-bases de datos de ChemSpider, HMDB, KEGG, Urine metabolome Database y AnalyteDB. Los criterios para la identificación fueron: un error de masa < 5 ppm y un m Sigma < 50 . Por último, un análisis de discriminación por mínimos cuadrados parciales fue realizado para calcular los valores de importancia de la variable para la proyección (VIP) como una medida de la contribución de metabolitos individuales en la diferencia entre los dos grupos.

3.3.5. Hidrólisis de orinas para distinción de metabolitos de ácido indol-3-acético

Los resultados del análisis metabolómico mostraron que el ion m/z 369.1305 con tiempo de retención 6.94 min se fragmenta formando el ion m/z 176.0707 observado con el mismo tiempo de retención. Por otro lado, el ion m/z 176.0707 se presenta también con tiempo de retención 9.48 min y fue detectado como ácido indol-3-acético (3IAA). Con base a estos resultados, el ion m/z 369.1305 fue anotado como ácido indol-3-acético-O-glucurónico (3IAA-G).

Debido a la falta de un estándar auténtico de 3IAA-G, se procedió a analizar una muestra de orina de un voluntario, para lo cual se obtuvo la primera orina de la mañana en ayuno. La muestra fue procesada mediante extracción en fase sólida (SPE) utilizando un cartucho con fase sólida hidrofílica-lipofílica (HLB) con el fin de eliminar la matriz química. Los cartuchos SPE fueron lavados/precondicionados con 3 mL de metanol, 3 mL de ácido fórmico pH 2.0, 6 mL de agua, 3 mL de acetonitrilo y 3 mL de ácido fórmico pH 2.0. Se tomaron 3 mL de orina y se acidificó con ácido fórmico a una concentración final de 1.25 % v/v y un pH de 2.8 para posteriormente ingresarse en el cartucho. El cartucho fue lavado con 3 mL de ácido fórmico 1.25 %, y los analitos retenidos fueron eluidos utilizando 2 mL de formiato de amonio 50 mM en 30 % de acetonitrilo. La fracción eluida fue secada en SpeedVac hasta disminuir el volumen a 1 mL, esta alícuota fue diluida 10 veces en ácido fórmico 0.1 %, y 5 μ L fueron inyectados en el sistema HPLC-DAD/FLD con los parámetros mostrados en la Tabla 1.3. Se determinó la presencia de 3IAA, para lo cual, una muestra de estándar de 3IAA fue procesada de la misma manera que las muestras y analizada bajo las mismas condiciones cromatográficas.

Además, una vez asignada la señal de 3IAA y detectada una señal adicional con las mismas características espectrales en detección por DAD como por FLD (identificada por capHPLC-ESI-Q-TOF-MS como 3IAA-G), pero con el tiempo de retención más corto, se realizó una hidrólisis para comprobar que la señal de 3IAA-G se descomponía para producir 3IAA, lo cual se vería afectado en una disminución de la señal más polar, y un aumento de la señal de 3IAA. Para esto, se preparó un duplicado de la orina del paciente voluntario de la misma forma como se describió anteriormente, en cartuchos de SPE-HLB. A una cantidad de 200 μ L de orina se le agregaron 33 μ L de HCl 12 M, mientras que a la otra sólo se agregó agua como muestra control. Ambas muestras fueron calentadas a 80 °C durante 60 min. Posteriormente a cada muestra se le agregaron 10 μ L de H₃PO₄ 14.6 M, y posteriormente se neutralizó con NaOH 10 M hasta obtener un pH de 6.4; se tomó una alícuota de 35

μL y se diluyó con 215 μL de ácido fórmico 0.1 % para ser analizadas mediante HPLC-DAD/FLD con los mismos parámetros descritos en la Tabla 1.3.

Tabla 1. 3: Parámetros utilizados para el análisis cromatográfico de orinas y del estándar de 3IAA procesados mediante SPE tipo HLB, mediante HPLC-DAD/FLD

Parámetro	Valor		
Columna	Hypersil C18 (125 x 40 mm, 3 μm)		
Temperatura	40 °C		
Velocidad de flujo	0.7 mL min ⁻¹		
Gradiente de elución	Tiempo(min)	ACN	Ácido fórmico 0.1 %
	0	2	10
	12	40	10
	13	80	10
	14	2	10
λ de detección espectrofotométrica (DAD)	280 nm		
Detección fluorimétrica (FLD)	λEx : 278 nm		
	λEm : 360 nm		

3.4. Resultados y discusión

En el análisis por cromatografía de líquidos - espectrometría de masas de alta resolución se obtiene una cantidad muy grande de datos que incluyen espectros de masas y masas-masas adquiridos en un intervalo de m/z establecido, durante la corrida cromatográfica. El análisis de estos datos es retador y realizarlo de manera manual representaría una gran demanda de tiempo y de esfuerzo. Actualmente, existen diferentes programas de análisis de datos incluidos en el software que ofrece el fabricante del equipo, pero también existen varias plataformas diseñadas a base de diferentes algoritmos que pueden utilizarse para datos crudos adquiridos con equipos diferentes.

Como ya se mencionó antes, los criterios del diagnóstico de SM han permitido seleccionar para este estudio a 52 pacientes con síndrome y 50 personas sanas como grupo control; sin embargo, este grupo era demasiado grande para el estudio metabólico comparativo en nuestras condiciones (204 cromatogramas, considerando dos replicas técnicas de cada muestra). Es por ello que se decidió llevar a cabo el análisis de componentes principales (PCA), con base en los parámetros antropométricos y clínicos de todos los pacientes. De esta manera, se buscó disminuir ambos grupos y asegurar que los sujetos finalmente seleccionados fuesen lo más representativos posible para el fenotipo del SM y del fenotipo de una persona sana, respectivamente.

3.4.1. Parámetros y selección de muestras mediante análisis de componentes principales (PCA)

Utilizando un análisis de componentes principales (PCA) de 23 parámetros clínicos y antropométricos en 102 personas, se obtuvo un modelo con poca significancia estadística, puesto que PC1 y PC2 explican < 60 % de la variabilidad total de los datos. En la gráfica de puntajes (más comúnmente referido por la palabra en inglés scores) de este modelo inicial (Fig. 1.1) se observa la separación de los pacientes con SM y de los sanos con respecto al eje PC1, sin embargo para muchos pacientes, los valores de PC1 y PC2 son muy bajos.

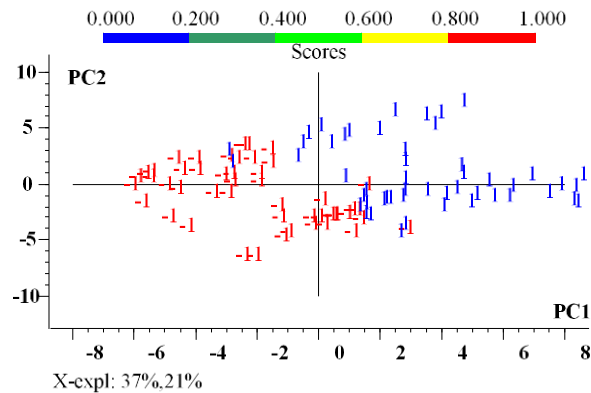


Fig. 1. 1: Gráfica de puntaje del modelo de análisis de componentes principales (PCA) de 102 individuos (52 pacientes con SM y 50 pacientes sanos) utilizando los 23 parámetros descritos en la sección 2.2.3. -1: pacientes sin SM detectado (controles). 1: pacientes sanos.

Debido a esta poca explicación de la varianza en el modelo PCA y a la cercanía de muchas muestras (participantes) al origen de coordenadas PC1-PC2, se optó por eliminar del PCA aquellos sujetos que se encontraban en el rango de -0.5 a 1.5 de varianza en PC1, para así obtener los individuos de mayor importancia de separación entre sanos y SM, con base en 23 variables medidas. El nuevo modelo PCA se muestra en la Fig. 1.2, donde se observa que los dos primeros componentes principales describen 78 % del total de la variabilidad de los datos, lo que es indicativo de la significancia estadística del análisis PCA. En la gráfica de puntajes (Fig. 1.2a), se visualiza una clara separación de 5 pacientes femeninos con SM, 6 pacientes masculinos con SM, 5 hombres sanos y 8 mujeres sanas (Fig. 1.2a). Por su parte, en la gráfica de influencias de variables (referido normalmente como X-loadings) (Fig. 1.2b) se nota la asociación de la mayoría de las variables con el grupo de SM, mientras que los parámetros de (19)-agua corporal y (3)HDL-C son relacionados con el grupo control sano. Las 24 personas cuyos parámetros fueron incluidos en el PCA, fueron seleccionadas para el análisis metabolómico. Cabe mencionar que, dentro de este grupo, la prueba t-Student mostró importantes diferencias estadísticas para la gran mayoría de parámetros, con excepción de (20)-edad y (4)-LDL-C (Tabla 1.4).

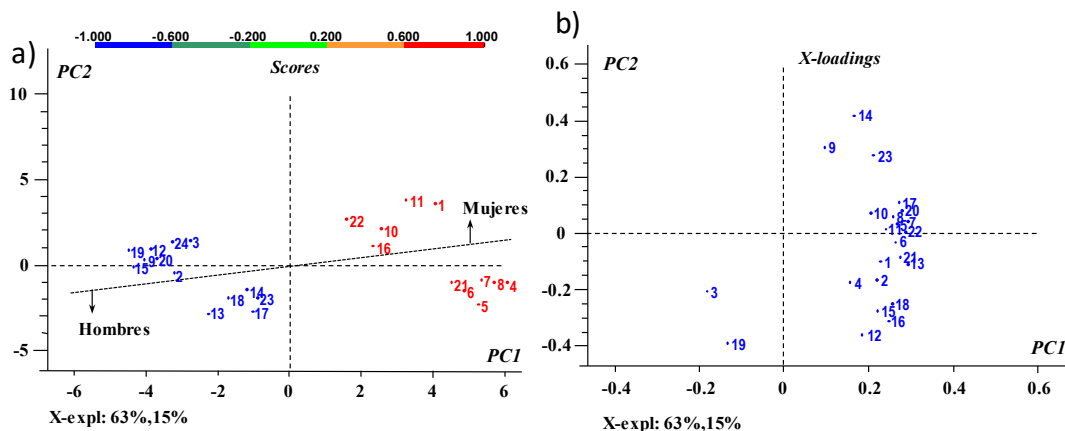


Fig. 1. 2: Modelo PCA construido con base a 23 parámetros antropogénicos y clínicos evaluados en 11 pacientes con SM y 13 controles. a) gráfica de puntajes que muestra la distribución de individuos en las coordenadas de los dos primeros componentes principales; b) gráfica de influencia de variables que muestra la distribución de los 23 parámetros analizados en las mismas coordenadas PC1 y PC2.

Tabla 1. 4: Parámetros clínicos y antropométricos medidos para 24 sujetos seleccionados con base a PCA para el análisis metabólico. Los valores de significancia p fueron obtenidos aplicando la prueba estadística t de student de dos colas

Parámetro	Pacientes SM		Grupo control		
	Intervalo	Promedio ± DE	Intervalo	Promedio ± DE	Valor p
Sujetos		11		13	
Mujeres/Hombres		5/6		8/5	
Edad, años	30 - 44	37.3 ± 4.7	30 - 44	36.5 ± 4.6	0.570
Glucosa, mg/dL	87 - 116	99 ± 8	71 - 99	84 ± 8	0.00012
Colesterol, mg/dL	165 - 265	209 ± 32	101 - 229	166 ± 30	0.0017
HDL-C, mg/dL	52 - 68	56 ± 5	64 - 77	71 ± 5	<0.00001
LDL-C, mg/dL	65 - 150	102 ± 28	14 - 137	81 ± 29	0.0623
VLDL-C, mg/dL	31 - 81	50 ± 16	9 - 19	14 ± 4	<0.00001
AIP	2.89 - 4.91	3.72 ± 0.57	1.36 - 3.09	2.33 ± 0.43	<0.00001
TG, mg/dL	156 - 406	251 ± 80	47 - 96	70 ± 19	0.0086
TG/HDL-C	2.44 - 7.81	4.52 ± 1.62	0.61 - 1.39	0.99 ± 0.28	<0.00001
HbA1c, %	4.4 - 6.0	5.1 ± 0.5	4.3 - 5.6	4.8 ± 0.3	0.0214
PS Sistólica, mmHg	109 - 142	128 ± 12	90 - 124	107 ± 10	0.00005

Tabla 1.4 (Continuación): Parámetros clínicos y antropométricos medidos para 24 sujetos seleccionados con base a PCA para el análisis metabolómico. Los valores de significancia p fueron obtenidos aplicando la prueba estadística t de dos colas

	Intervalo(SM)	Promedio ± DE (SM)	Intervalo (Control)	Promedio ± DE (Control)	Valor p
PS Diastólica, mmHg	78 - 108	88 ± 8	57 - 90	69 ± 9	0.00002
Estatura, m	1.48 - 1.75	1.67 ± 0.09	1.45 - 1.75	1.59 ± 0.09	0.0332
Peso, kg	73.1 - 106	90.8 ± 11.1	46.3 - 68.9	57.1 ± 8.1	<0.00001
Grasa corporal, %	29.5 - 47.2	36.3 ± 6.1	18.3 - 33.8	25.6 ± 4.6	0.00003
Masa muscular, %	42.2 - 69.7	55.3 ± 11.0	32.6 - 53.0	40.6 ± 7.8	0.00050
Masa esquelética, %	2.3 - 3.6	2.9 ± 0.5	1.8 - 2.8	2.2 ± 0.4	0.00032
IMC, kg/m ²	29.2 - 34.7	32.6 ± 1.9	19.6 - 25.1	22.6 ± 1.9	<0.00001
Consumo kcal/day	2167 - 3426	2752 ± 484	1664 - 2534	1999 ± 321	0.00008
Agua corporal, %	39.6 - 50.1	46.0 ± 3.4	48.1 - 58.4	53.8 ± 3.1	<0.00001
Edad metabólica, años	53 - 84	72 ± 10	17 - 47	30.2 ± 10	<0.00001
Grasa visceral, %	6 - 16	12 ± 3	2 - 9	5 ± 2	0.00008
Cintura, cm	95 - 114	104 ± 7	67 - 87	76 ± 7	<0.00001
Grasa corporal superior, %	31.6 - 46.0	36.3 ± 4.8	17.8 - 33.6	24.4 ± 4.7	<0.00001

SM: síndrome metabólico, DE: desviación estándar, HDL-C: concentración de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, LDL-C: concentración de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad, AIP: índice aterogénico en plasma, TG: concentración de triglicéridos, HbA1c: prueba de hemoglobina glicosilada, IMC: índice de masa corporal

3.4.2. Identificación de metabolitos de mayor abundancia en orinas de pacientes con síndrome metabólico respecto al grupo control

Los cromatogramas obtenidos de las muestras de orinas de los pacientes de los grupos sano y con SM mediante capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS muestran diferencias que pueden notarse visualmente (Fig. 1.3). Los cromatogramas de las muestras fueron procesados con ayuda del software Data Analysis, llevando a cabo la recalibración y sustracción del ruido. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa MetaboScape. Con base en los resultados de la prueba t, en la que se compararon los datos LC-MS de orinas obtenidas de dos grupos de pacientes, se generó la gráfica

volcano (Fig. 1.4). Para ello, se aplicaron los criterios de Razón de cambio > 3 a un valor de significancia $p < 0.05$, encontrándose varios iones con mayor abundancia en SM comparado con el grupo control. Además de las características moleculares que cumplieron con los parámetros anteriores, se incluyeron dos características moleculares con una razón de cambio de 2.87 y otra de 2.13.

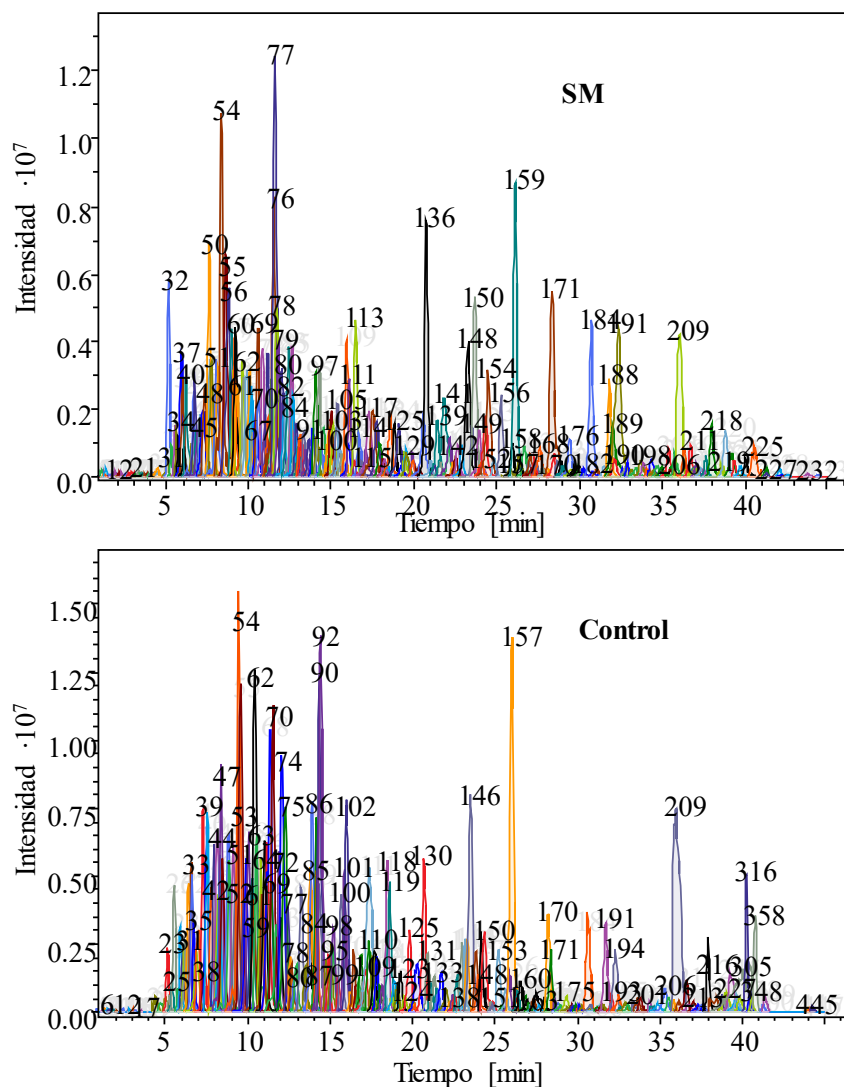


Fig. 1. 3: Cromatogramas deconvolucionados obtenidos en capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS para una muestra Control y una de SM, elegidas aleatoriamente.

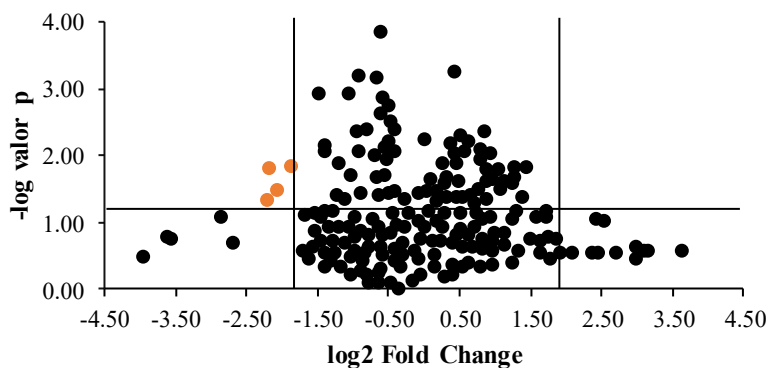


Fig. 1. 4: Gráfica volcano obtenida al aplicar una prueba t para comparar los datos de capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS entre dos grupos de pacientes. En color amarillo se marcan las características moleculares de mayor abundancia en SM, aplicando los criterios: Razón de cambio ≥ 3 y un valor de significancia $p \leq 0.01$.

En la Tabla 1.5 se muestran los metabolitos de mayor abundancia en SM, identificados mediante el flujo de trabajo MetaboScape, donde se muestra información concerniente a tiempo de retención, valores experimentales de m/z , cantidad de fragmentos en el espectro MS/MS y el porcentaje de concordancia con la fragmentación *in silico* para la asignación de sus estructuras moleculares.

Tabla 1. 5: Lista de metabolitos de mayor abundancia en SM respecto al grupo control, detectados mediante prueba t e identificados con ayuda de MetaboScape

Metabolito	TR	Fórmula iónica	m/z	$\Delta m/z$, ppm	Score	NºFragm	IntCov, %
Hidroxihexanoicarnitina	5.75	$[C_{12}H_{26}NO_3]^+$	232.1907	1.55	1.0	2	100
N(indol-3-ilacetil) glutamina	6.31	$[C_{15}H_{18}N_3O_4]^+$	304.1292	0.47	1.0	6	100
Ácido indol-3-carboxílico	6.48	$[C_9H_8NO_2]^+$	162.0545	-1.92	1.0	4	100
Ácido indol-3-acético-O-glucurónido	6.94	$[C_{16}H_{18}NO_8]^+$	352.1027	1.09	1.0	12	100
Indol-3-carbaldehído	9.43	$[C_9H_8NO]^+$	146.0603	2.03	0.881	2	100
Ácido indol-3-acético	9.46	$[C_{10}H_{10}NO_2]^+$	176.0700	-3.28	0.984	2	100

TR – tiempo de retención, min, Score – Puntaje de identificación en MetaboScape®, NºFragm - número de iones en el espectro MS/MS del ion precursor, IntCov – concordancia entre los fragmentos experimentales y los fragmentos *in silico* de las bases de datos.

Los programas utilizados para identificar compuestos usualmente lo hacen comparando parámetros analíticos (en nuestro caso valores de masa exacta y patrones de fragmentación de masas) obtenidos experimentalmente con respecto a bibliotecas que poseen una base de datos de los valores conocidos o generados *in silico* para un gran número de compuestos existentes. En este sentido, el “Score” es un valor que indica qué tan parecidos son los valores analíticos experimentales en comparación con

los valores de los compuestos de las bibliotecas. Los valores “Score” en el caso de MetaboScape se encuentran en el rango de 0-1, donde 0 representa ninguna coincidencia entre el compuesto experimental con respecto al comparado de la biblioteca, y 1 representa una total concordancia entre el compuesto experimental y el de la base de datos, por lo que los compuestos experimentales con valores altos de score (iguales a 1 o muy cercanos a este valor) serán identificados como el compuesto asignado en la base de datos. En MS también son muy útiles los valores de error de masa, que representan la diferencia que existe entre la masa exacta de un ion con respecto a la masa exacta de un compuesto calculada por su composición, una de las formas más utilizada para determinar esta diferencia de masa es con la ecuación $\Delta m_i = \left| \frac{m_i - m_a}{m_a} \cdot 10^6 \right|$, donde Δm_i representa el error de masa en partes por millón (ppm), m_i representa la masa con la cual se está comparando, y m_a es la masa del compuesto que se midió experimentalmente. Para una identificación exacta se requiere que el error de una masa experimental comparada con la de una composición específica sea $|\Delta m_i| \leq 5$ ppm [44]. Otro parámetro importante es la coincidencia entre el patrón isotópico teórico comparado con el experimental, para lo cual se calcula el valor estadístico sigma (mSigma) el cual representa la varianza entre los patrones isotópicos teórico vs experimental, y es representado con un score basándose en la coincidencia de la posición de los isótopos, la distancia entre ellos, y los valores de abundancia de las señales de los isótopos. Por lo general, los valores mSigma < 50 se consideran aceptables.

Todos estos parámetros fueron aplicados para realizar la identificación de compuestos que se muestran en la Tabla 1.5, de los cuales, cinco pertenecen a productos del catabolismo del triptófano, los cuales se encuentran con mayor abundancia en los pacientes con SM con respecto a las muestras control. En orden de elución los metabolitos encontrados bajo los criterios establecidos de comparación fueron: hidroxihexanoicarnitina, N(indol-3-ilacetil) glutamina, ácido indol-3-carboxílico (3ICA), ácido indol-3-acético-O-glucurónido (3IAA-G), indol-3-carbaldehído (3-IAld), y ácido indol-3-acético (3IAA), para los cuales el score del patrón isotópico mSigma no excedió el valor de 25 en ningún caso, el error de masa no sobrepasó 5 ppm, los valores Score fueron 1 en tres casos y en los demás el valor mínimo obtenido fue de 0.881, lo cual demuestra una buena concordancia entre los patrones isotópicos experimentales y aquellos en bases de datos *in silico*.

Es importante mencionar que el 3IAA-G no fue encontrado en las bibliotecas disponibles, y su identificación fue lograda mediante el programa Metabolite Predict (Bruker Daltonics). Específicamente, para la identificación, se tomaron en cuenta los siguientes tres iones de la misma simetría, eluidos en el tiempo de retención 6.94 min, con m/z 369.1278 correspondiente al aducto 3IAA-G con amonio $[M+NH_4]^+$, m/z 352.1027 correspondiente a la molécula protonada $[M+H]^+$, y m/z 176.0605 correspondiente a la molécula de 3IAA protonada. La diferencia de masa entre los iones m/z 369.1278 y m/z 176.0605 fue anotada como una pérdida neutra correspondiente al glucurónido ($C_6H_8O_6$) y amonio con un error de masa de 0.0010 Da (Fig. 1.5).

Dos de los metabolitos fueron encontrados parcialmente solapados en la separación cromatográfica, éstos fueron 3-IAld (tiempo de retención 9.43 min, m/z 146.0603) y 3IAA (tiempo de retención 9.46 min, m/z 176.0700). Gracias a la adquisición de masa exacta para los iones precursores y sus patrones de fragmentación, ambos se pudieron identificar con un alto Score (Tabla 1.5 y Fig. 1.6)

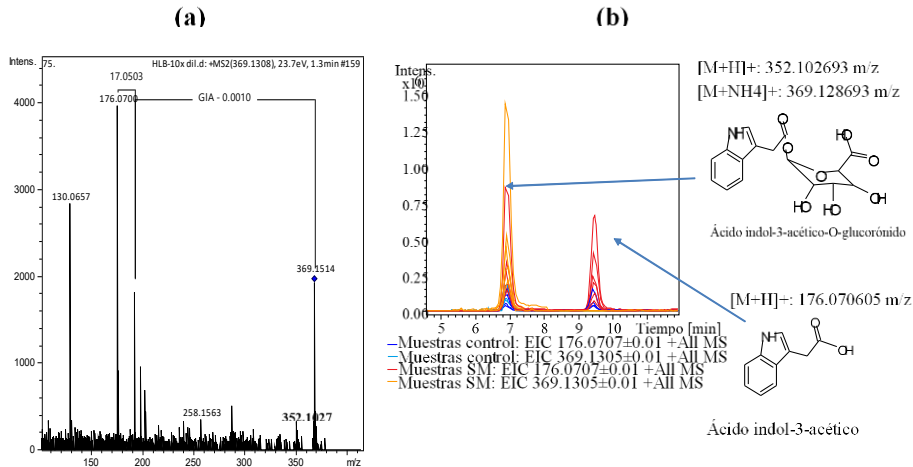


Fig. 1. 5: Identificación de ácido indol-3-acético-O-glucurónico. a) Espectro de masas adquirido en el tiempo de retención 6.94 min. b) Cromatograma de ion extraído de ácido indol-3-acético (tiempo de retención 9.46 min) y su conjugado glucurónico (tiempo de retención 6.94 min) obtenido para los 24 sujetos analizados (rojo: pacientes con SM; azul: pacientes sanos).

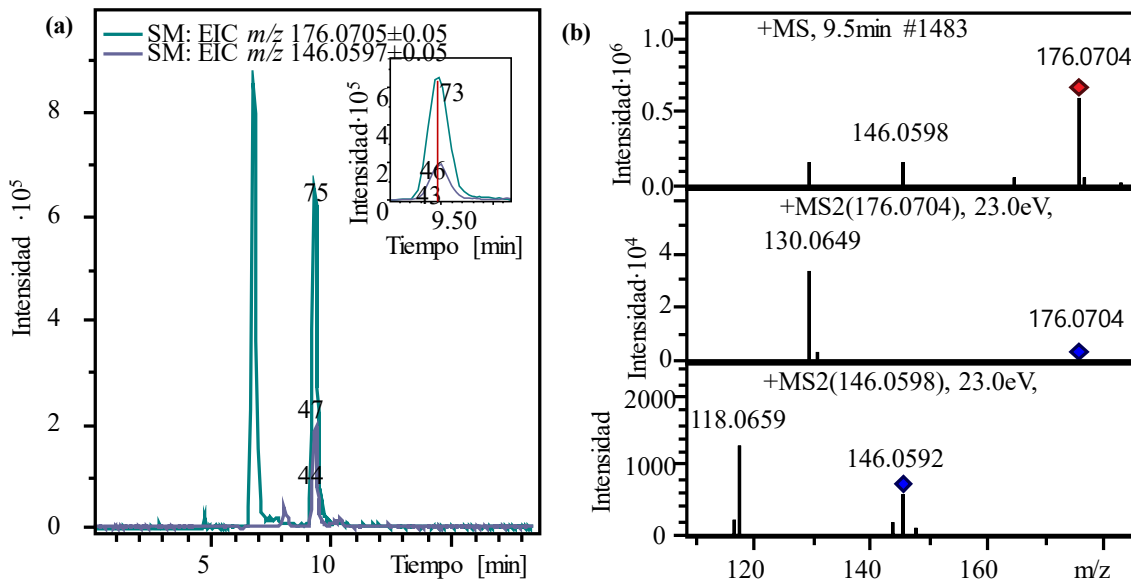


Fig. 1. 6: Anotación de indol-3-carbaldehído y de ácido indol-3-acético con base en espectros MS y MS/MS. a) Cromatograma de ion extraído para los valores m/z 176.0705 ± 0.05 (ácido indol-3-acético) y m/z 146.0597 ± 0.05 (indol-3-carbaldehído) b) Arriba, escaneo total del espectro de MS adquirido en el tiempo de retención 9.5 ± 0.1 min; en medio y abajo, espectro de los dos iones precursor m/z 176.0705 y m/z 146.0597, respectivamente.

3.4.3. Separación de ácido-3-indol acético de ácido-3-indol-acético-glucurónido

Para obtener una evidencia adicional que confirme la identidad de 3IAA-G, se llevó a cabo un experimento de hidrólisis ácida de una orina, esperando que el compuesto anotado como 3IAA-G se convierta en 3IAA. Para ello se analizó la orina de un paciente voluntario, tal como se describe detalladamente en la sección 2.2.5. Una vez que la muestra cargada en cartuchos de SPE, la fracción eluida se analizó por HPLC con detección espectrofotométrica de arreglo de diodos a una longitud de onda de 280 nm, característica del 3IAA; de forma paralela se utilizó un detector FLD con una longitud de onda de excitación de 278 nm, y adquiriendo el espectro de emisión en un rango de longitudes de onda de 320 – 480 nm. La selección de las condiciones de detección se adaptó de un estudio anterior (máximo de emisión para 3IAA en 360 nm) [45]. Además de las muestras procesadas, se inyectó también en el sistema de preconcentración y de separación cromatográfica un estándar de 3IAA.

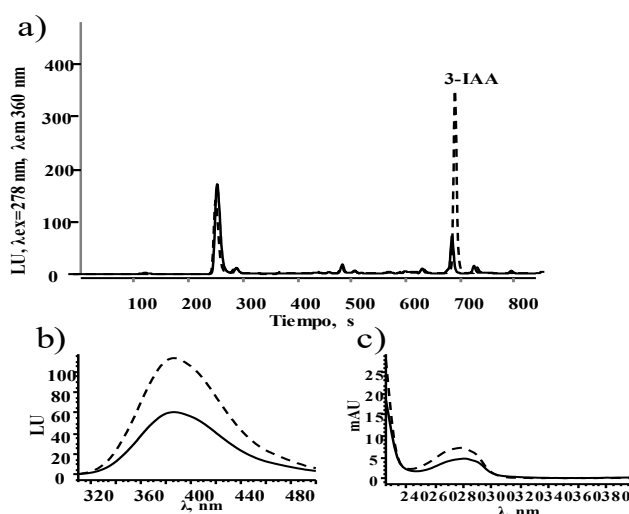


Fig. 1. 7: a) Cromatogramas con detección fluorimétrica: – orina de un voluntario después de pretratamiento SPE. (---) la misma muestra con una adición de estándar de 3IAA 20 mg L⁻¹. b) Espectros de emisión adquiridos en el ápex de los dos picos cromatográficos en un rango de 320-480 nm con una λ de excitación de 278 nm: (–) tiempo de retención 4.2 min (3IAA-G) y (---) tiempo de retención 11.4 min (3IAA) c) Espectros de absorción adquiridos en el ápex de los dos picos cromatográficos 240-380 nm: (–) tiempo de retención 4.2 min (3IAA-G) (---) tiempo de retención de 11.4 min (3IAA).

En el análisis de orina no hidrolizada se puede observar la elución de dos compuestos, el primero con un tiempo de retención de 4.2 min y el segundo con un tiempo de retención de 11.4 min (Fig. 1.7a), esta última señal corresponde al 3IAA, confirmado por el experimento de adición de estándar y por la concordancia de su espectro de absorción UV y su espectro de fluorescencia con los del estándar 3IAA. Cabe señalar que en este experimento la recuperación del estándar de 3IAA adicionado directamente a la orina fue de 99 %. Es importante mencionar que los espectros de emisión ($\lambda_{\text{max}} = 360$ nm) con excitación en 278 nm, son similares para ambos picos cromatográficos tanto en la de TR 4.2 min como en la de TR 11.4 min; así mismo, sus espectros de absorción coinciden ($\lambda_{\text{max}} = 280$ nm) (Fig. 1.7 b y 1.7 c). Esto confirma que ambos compuestos poseen propiedades estructurales similares y que el primero en eluir es más polar respecto a 3IAA (de acuerdo con las propiedades del

glucurónido). Para confirmar que la primera señal en el cromatograma (tiempo de retención 4.2 min) es un compuesto conjugado del 3IAA, se realizó una hidrólisis con HCl, además de analizar una muestra con el mismo procedimiento, pero sin agregar HCl. En la Fig. 1.8 se muestran los dos cromatogramas obtenidos: la línea continua se usó para la muestra sin hidrólisis y la línea punteada para la muestra hidrolizada. Es relevante notar que, para la muestra no hidrolizada se presentan ambas señales, la primera correspondiente probablemente a 3IAA-G y la segunda asignada a 3IAA. En el cromatograma de muestra hidrolizada se observa una clara disminución de la primera señal, mientras que la intensidad del 3IAA aumentó confirmando la conversión del primer compuesto en 3IAA.

Al sumar todas estas evidencias obtenidas en este trabajo (datos LC-MS y MS/MS junto con el análisis HPLC-DAD/FLD de orina hidrolizada comparada con no-hidrolizada), se puede concluir que el compuesto en cuestión es el conjugado de 3IAA con el ácido glucurónico (3IAA-G)

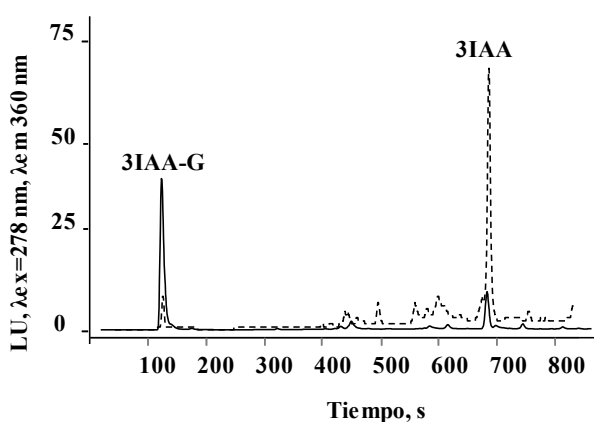


Fig. 1. 8: Cromatogramas HPLC-FLD de dos alícuotas de orina de un voluntario, calentadas a 80 °C durante 1 h, con un posterior tratamiento de preconcentración con cartuchos SPE: (–) muestra control sin hidrolizar y (---) alícuota de la misma muestra después de la hidrólisis ácida.

3.4.4. Contribución de metabolitos identificados en la diferencia entre perfiles metabólicos en orinas de pacientes con SM respecto al grupo control sano

Debido a la contribución de seis metabolitos identificados para las diferencias en perfiles metabólicos entre pacientes con SM respecto al grupo control sano, las razones de cambio de sus abundancias en conjunto con sus respectivos valores de significancia *p* obtenidos de la gráfica Volcano se enlistan en la Tabla 1.6; con base en el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS) realizado en MetaboScape, los valores de importancia de variable en la proyección (VIP) se muestran también en la Tabla 1.6, los cuales indican la importancia de cada variable (en este caso los compuestos) en la proyección usada en un modelo PLS. Para una mejor claridad los cambios en las abundancias de los metabolitos se presentan en un gráfico de caja y bigotes (Fig. 1.9). Se tomaron en cuenta dos metabolitos con una razón de cambio < 3 debido a que presentaron valores de VIP relativamente altos.

Tabla 1. 6: Contribución de metabolitos identificados en diferencia entre perfiles metabólicos de orina de pacientes con SM y pacientes sanos.

Metabolito	Razón de cambio	p	VIP
Ácido indol-3-acético	3.25	0.034	2.45
Ácido 3-indol-acético-O-glucurónido	3.67	0.047	1.86
N(indol-3-ilacetil) glutamina	3.49	0.014	1.66
Indol-3-carbaldehído	3.89	0.048	0.72
Ácido indol-3-carboxílico	2.13	0.009	0.58
Hidroxihexanoicarnitina	2.87	0.014	0.56

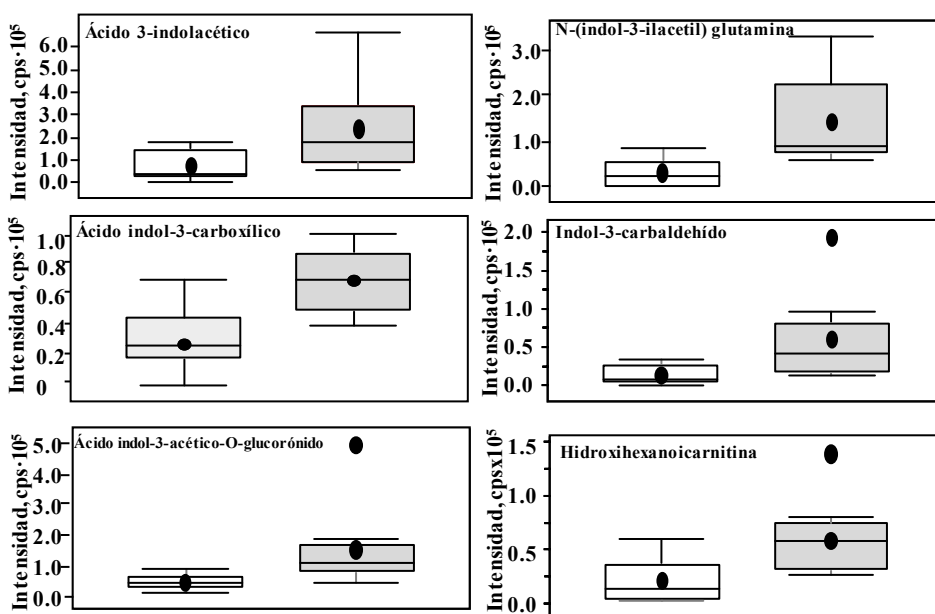


Fig. 1. 9: Diagramas de caja y bigotes generados por MetaboScape para los 6 metabolitos identificados en pacientes con SM (cajas grises) y del grupo control (cajas blancas). El valor promedio está representado por la línea sólida dentro de cada caja, y los extremos de la caja representan el 75 y 25 percentil, las líneas exteriores de las cajas (bigotes) denotan los percentiles 5 y 95, respectivamente, los círculos dentro y fuera de las cajas corresponden a las medias y los valores atípicos, respectivamente. Todos los cambios fueron significativos a $p < 0.05$.

3.4.5.Relevancia de los metabolitos derivados del triptófano en los pacientes con síndrome metabólico

Entre los seis metabolitos sobre-expresados en SM respecto al grupo control, cinco fueron compuestos indólicos, derivados del catabolismo de triptófano. Los cambios en los niveles de triptófano libre y de sus rutas metabólicas, así como la importancia de los microorganismos comensales del intestino en el catabolismo del triptófano han sido ampliamente estudiados en relación con diversas condiciones de salud humana [46, 47]. Existen reportes que sustentan evidencia sobre la intervención de la ruta metabólica quinurénica sobre el SM, diabetes y otros desórdenes relacionados [46, 48]. La ruta metabólica quinurénica ocurre principalmente en el hígado, en el cual más del 90 % del triptófano es convertido a quinurenina para producir al final de la ruta el cofactor redox NAD⁺; no obstante, este proceso también puede llevarse a cabo fuera del hígado y juega un papel importante durante la activación del sistema inmune [49]. La relación quinurenina/triptófano tanto en plasma como en suero ha sido contemplada como un biomarcador de la actividad de la enzima 2,3-dioxigenasa, cuyas alteraciones están estrechamente relacionadas con estrés oxidativo, procesos de inflamación y respuesta inmune [48, 50]. Sin embargo, es importante resaltar que esta medición es cuestionable debido a los múltiples factores que pueden afectar los niveles circulantes tanto de triptófano como de quinurenina [51].

En este trabajo se optó por analizar orinas como fuente rica e importante de metabolitos, comúnmente utilizada en análisis mediante técnicas metabolómicas basadas en LC-MS [52-56]. Los cinco metabolitos de mayor contribución en la diferencia entre perfiles metabolómicos en orinas de SM respecto al grupo control sano, son compuestos indólicos, producto del catabolismo del triptófano por la flora intestinal y, en menor medida, también son metabolitos endógenos del huésped [57]. Los procesos microbianos representan la degradación de aproximadamente el 5 % del triptófano en el cuerpo humano, este proceso requiere de la actividad bacteriana de la enzima triptofanasa y descarboxilasa, las cuales producen compuestos indol y un conjunto de sus derivados [57, 58]; estos compuestos pueden atravesar la barrera intestinal hacia el flujo sanguíneo y ser excretados mediante la orina. Por lo general, el perfil de indoles en la orina depende del consumo de triptófano en la dieta, aunque también depende de factores de vulnerabilidad individual que afectan la disponibilidad de triptófano libre, la variabilidad metabólica debida a la actividad de la flora intestinal, la interacción entre las rutas metabólicas del huésped y bacterias, la permeabilidad de la barrera intestino-flujo sanguíneo, y la eficiencia en el transporte por células renales proximales [57-60].

El valor más alto de VIP en este estudio correspondió al 3IAA (VIP 2.45, Cambio 3.25, p 0.034) (Tabla 1.5; Fig. 1.9), el cual es un metabolito tanto bacteriano como endógeno del humano. En concordancia con nuestros resultados, el 3IAA ya había sido anteriormente reportado en orinas de individuos sanos [61, 62], aunque también ha sido clasificado como una toxina urémica por el Grupo de Trabajo Europeo de Toxinas Urémicas [63]; altos niveles de este metabolito están asociados con la diabetes, enfermedades cardiovasculares y de riñón [52, 60, 63-67]. En cuanto a los efectos biológicos, el 3IAA actúa como un ligando débil de receptores de hidrocarburos arilo y su impacto en la permeabilidad intestinal y la inmunidad del huésped han sido estudiados [46, 68], además, la activación de los receptores de hidrocarburos arilo ha sido asociada con un aumento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares [57, 69].

Una conjugación con ácido glucurónico, conocida como fase II del metabolismo, aumenta la solubilidad en agua de varios xenobióticos, fármacos y metabolitos, facilitando así su transporte a través del cuerpo y su posterior excreción en la orina; en nuestro estudio, el segundo metabolito con mayor cambio de abundancia y un alto valor de VIP fue el 3IAA-G (VIP 1.86, razón de cambio 3.67, p 0.047) (Tabla 1.5, Fig. 1.9). Utilizando un estrategia basada en LC-MS similar que en este estudio (pérdidas neutras), dicho metabolito fue identificado en orina humana por Li et al [70] y además, fue encontrado en mayor abundancia en pacientes con cáncer en comparación con pacientes sanos. El 3IAA-G fue propuesto como un biomarcador potencial para detectar cáncer de mama. En otro trabajo realizado en adultos mayores en Italia, se propuso el 3IAA-G como un marcador del metabolismo de triptófano relacionado con el consumo de nueces [71].

Además de la glucoronidación, la sulfonación es otro tipo de conjugación que se lleva a cabo en el hígado; de hecho, existen evidencias experimentales sólidas sobre la conversión del indol en 3-indoxil sulfato y su excreción en orina. El 3-indoxil sulfato es considerado una toxina cardíaca [46, 59, 72]. En nuestro estudio el metabolito 3-indoxil sulfato no fue detectado entre los metabolitos discriminantes del grupo de pacientes con SM sobre el grupo control, pero los cambios observados en el 3IAA-G indican un aumento en la conjugación del 3IAA en pacientes con SM, posiblemente como respuesta al aumento de su producción. Una mayor abundancia de N(indol-3-ilacetil) glutamina en pacientes con SM (razón de cambio 3.67, p 0.014, VIP 1.86) (Tabla 1.5, Fig. 1.9) parece confirmar la formación de conjugados del 3IAA para ayudar a su excreción en orina, sobre todo cuando 3IAA se encuentra en concentraciones elevadas. También es importante mencionar que la N(indol-3-ilacetil) glutamina ha sido anteriormente reportada como un metabolito de la orina asociado con el SM [64] y diabetes [73].

Además de los metabolitos ya descritos, dos metabolitos adicionales, con valores VIP de 0.72 y 0.58 fueron identificados como indol-3-carbaldehído (razón de cambio 3.89, p 0.048) y ácido indol-3-carboxílico (razón de cambio 2.13, p 0.009), respectivamente (Tabla 1.5, Fig. 1.9). Debido a que estos dos compuestos son productos de oxidación del 3IAA [57], las condiciones pro-oxidativas que acompañan al SM podrían explicar un aumento de sus niveles en orinas de individuos con SM respecto al grupo control sano. En conformidad con nuestros resultados, los niveles elevados de 3ICA ya han sido reportados en pacientes con SM [64], ratas con obesidad [72], enfermedades coronarias cardíacas [74], y en asociación con hiperlipidemia [75], además de que el 3-IAld ha sido reportado como un ligando de los receptores de hidrocarburos arilo [46]. En la Fig.1.10 se presenta la integración de los cinco metabolitos indólicos en un esquema general del metabolismo de triptófano en humanos.

Por último, se encontró la hidroxihexanoicarnitina como un metabolito con un VIP relativamente bajo (0.56); aunque con una elevada razón de cambio de 2.87, a un p 0.014 (Tabla 1.5, Fig. 1.9). Este compuesto ha sido identificado recientemente en orina humana, y ha sido asociado con nefropatía membranosa idiopática [76]. Se sabe que el aumento de ésteres acil carnitina hidroxilados de ácidos grasos de cadena media en orina son indicativos de alteraciones en las rutas de oxidación de ácidos grasos, lo cual es una afección típica en individuos con obesidad además de estar relacionado al SM y diabetes. Este metabolito confirma las condiciones pro-oxidativas asociadas con el SM.

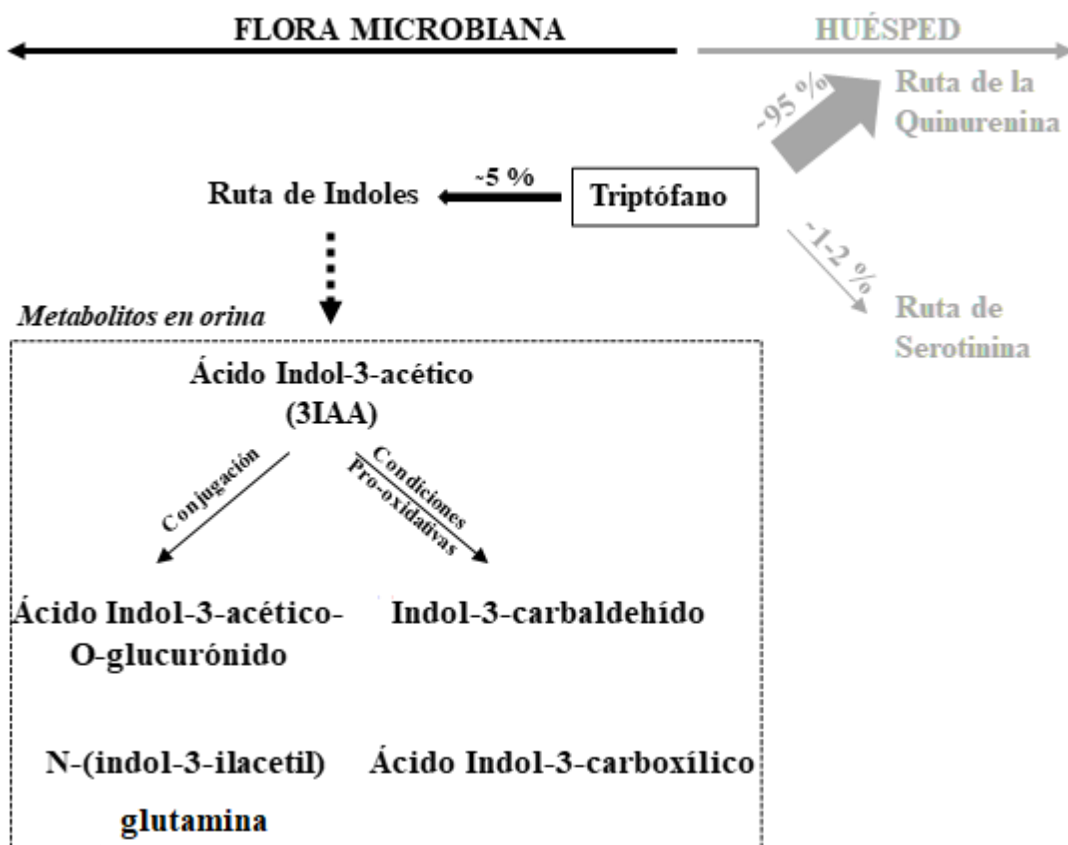


Fig. 1. 10: Metabolitos de orina asignados como la principal contribución en la diferencia entre sujetos con SM y el grupo control, integrado con un esquema general del metabolismo de triptófano. (Gris utilizado para remarcar las rutas del huésped, estudiado comúnmente en muestras de suero o de sangre. (---) indica que bajo los criterios aplicados de razón de cambio y valor de significancia p, no se encontraron intermediarios entre el triptófano y el 3IAA afectados por la condición de SM.

Como punto final de discusión se debe enfatizar que este trabajo ha sido enfocado en la identificación de metabolitos que aumentaron en orinas de pacientes con SM con respecto al grupo control; sin embargo, algunos compuestos de importancia pudieron ser omitidos debido a las condiciones aplicadas durante la preparación y análisis de las muestras en LC-MS. De forma más específica, los compuestos solubles en 80 % v/v de metanol y retenidos en una trampa C18 después de la acidificación del extracto, fueron analizadas en el sistema LC-MS en el cual sólo se exploró la ionización positiva por ESI.

3.5. Conclusiones

El análisis metabolómico no dirigido basado en cromatografía de líquidos en escala capilar y espectrometría de masas de alta resolución reveló la contribución de seis metabolitos importantes en la diferencia de los perfiles metabólicos en orinas del grupo con SM con respecto al grupo control en individuos reclutados en la ciudad de León, México. Cinco de estos metabolitos pertenecen a compuestos indólicos derivados del catabolismo de triptófano de la flora intestinal, aunque es importante considerar la posible formación de estos metabolitos de forma endógena en menor medida.

El aumento de los niveles de compuestos indólicos ha sido a menudo relacionado con condiciones pro-oxidativas y pro-inflamatorias del organismo, lo cual estaría acorde a su posible implicación con el SM. De hecho, está reportado que existe una asociación entre los metabolitos indólicos de triptófano con otras condiciones de salud. El aumento en los niveles de acil-carnitinas hidroxiladas de ácidos grasos de cadena media también fue observado en este trabajo, y es también un indicativo de condiciones pro-oxidativas existentes en pacientes con SM. En efecto, los resultados de metabolómica comparativa proporcionaron datos para evaluar el 3IAA como un potencial biomarcador, es decir, podría implementarse el análisis utilizando metabolómica dirigida, para así, específicamente ajustar las condiciones de procesamiento de muestras y de la selección de herramientas analíticas que permitan determinar este tipo de compuestos indólicos en orinas. De esta forma, la evaluación estadística en grupos mayores de individuos sanos y con SM determinando los metabolitos indólicos (con especial énfasis en 3IAA) podría diagnosticar la afección de forma más rápida y sencilla.

Tres metabolitos con altos valores de importancia de variable para la proyección (VIP) fueron el ácido indol-3-acético y dos de sus conjugados, el primero con ácido glucurónico (3IAA-G), y el segundo con glutamina. Otros dos compuestos indólicos corresponden a productos de oxidación del 3IAA. Los resultados de nuestro trabajo sugieren que el 3IAA podría ser un candidato como biomarcador del SM, no obstante, se sugiere realizar un proceso de hidrólisis con el objetivo de liberar este compuesto de sus conjugados, previo al análisis de las orinas.

De manera general, este estudio proporciona evidencia directa de una alteración en el catabolismo del triptófano en el síndrome metabólico

4. Capítulo 4: Aplicaciones de MP-AES en análisis de metales/metaloides en contexto de foodómica

4.1. Importancia de los metales/metaloides en el consumo de alimentos

Los metales y metaloides se encuentran a bajas concentraciones en los alimentos, y dependiendo de su forma química y de las cantidades disponibles en las que se consumen, algunos pueden tener efectos nutricionales importantes, y otros pueden presentar efectos tóxicos y perjudiciales a la salud [77]. Al menos 30 elementos son considerados esenciales por su importante papel en procesos bioquímicos en el organismo humano, algunos como Ca, K, Mg, P y Na se requieren en grandes cantidades, mientras que otros se requieren a niveles traza como Cu, Fe, Zn, Mn, Co, Mo, Ni, Se, etc. [78]. En el lado opuesto, existen elementos como el Pb, Cd, Ni, As, Hg que no presentan ninguna relevancia biológica como nutrientes, y que además son tóxicos incluso a bajas concentraciones [79].

Las fuentes que generan un alto potencial de elementos tóxicos que puedan ingresar en la cadena alimenticia y provocar efectos perjudiciales a la salud pueden proceder del uso de pesticidas, fertilizantes, agua contaminada y contaminantes ambientales [77], y por ello se realizan análisis de identificación de metales/metaloides aplicados en alimentos, como por ejemplo: análisis de azúcares (nutrientes y Cd, Cr, Pb por factores agrícolas, procesos industriales, minería, residuos tóxicos) [80], leche (contaminación por metales pesados por procesos de manufactura o empaquetado) [81], vino (concentraciones nutricionales pueden variar entre región y región) [82], jugo de frutas (asegurar beneficios nutraceuticos) [82], pescados y mariscos (metales y metaloides tóxicos acumulados por organismos marinos) [83], miel (origen botánico y geográfico) [84], chocolate (el cacao es afectado por compuestos de Cu) [85], productos para infantes (nutrientes responsables de desarrollo de los infantes y xenobióticos contaminantes) [86], vegetales (absorción de elementos tóxicos por vegetales) [87], harina (riesgo de contaminación por los procesos de molienda, en donde puede existir fragmentos metálicos, polvo mineral, pesticidas, microorganismos y metales pesados) [88].

Por lo tanto, la determinación de metales y metaloides en alimentos es de gran relevancia, y se requiere de la cuantificación exacta y precisa de los elementos, idealmente utilizando metodologías libres de interferencias en la medida de lo posible, con capacidades de detección suficientes para el cumplimiento de las regulaciones establecidas, asegurar y controlar una cantidad de nutrientes suficientes en los alimentos, además de garantizar que los efectos tóxicos debidos a metales pesados y/o metaloides se encuentren por debajo de un nivel de riesgo y así evitar efectos perjudiciales en los consumidores [89].

4.2. Espectrometría atómica en estudios de foodómica

Los análisis en el área de foodómica precisan de metodologías analíticas robustas, eficientes, sensibles, rentables, y que garanticen la seguridad, la calidad nutricional y rastreabilidad de los alimentos [77, 90]. Existen varias técnicas ampliamente utilizadas en análisis de alimentos como lo son diferentes tipos de espectrometrías, las cuales aprovechan la interacción de los compuestos presentes en los alimentos con la radiación electromagnética, tales técnicas incluyen Resonancia Magnética Nuclear (NMR), espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR), o espectroscopía ultravioleta-visible (UV/Vis), obteniendo información acerca de las propiedades y estructura de los compuestos, en su mayoría de naturaleza orgánica [10, 89]. En los análisis con enfoques de foodómica, cada matriz de alimento requiere una apropiada preparación, extracción y selección de la instrumentación, que

permitan la correcta implementación de su análisis [77], y uno de los mayores desafíos en el análisis de alimentos es realizar la cuantificación exacta de metales/metaloides en una matriz de alimentos que se caracterizan por presentar altas concentraciones de carbohidratos, proteínas, grasas o una combinación de estas, así como una variedad de otros elementos que pudieran provocar interferencias durante el análisis [91]. Para lograr disminuir dichas interferencias en los análisis, desde décadas pasadas se han establecido y utilizado técnicas de espectrometría atómica en sus distintas configuraciones de detección como espectrometría de absorción atómica (AAS), espectrometría de emisión atómica (AES) espectrometría de fluorescencia atómica (FAS) y espectrometría de masas atómica (MS) [10], y que en conjunto con pretratamientos de muestra que disminuyen la complejidad de las matrices de los alimentos, estas técnicas de espectrometría atómica han mostrado ser efectivas en el análisis elemental de una gran variedad de alimentos.

De manera breve, la AAS consiste en el proceso en el cual átomos libres en estado gaseoso absorben la radiación electromagnética producida por una fuente que genera longitudes de onda características para cada elemento. La instrumentación comercial más común con la que se producen dichas longitudes de onda características para cada elemento son las denominadas lámparas de cátodo hueco, las cuales consisten de un ánodo de tungsteno y un cátodo con forma de cilindro hueco hecho del elemento específico que se desea cuantificar [77]; estos componentes se encuentran sellados en un tubo profundido con un gas inerte (Ne o Ar) a presiones bajas. Una vez que el gas inerte bombardea el cátodo, éste excita los átomos del elemento en cuestión, produciendo la emisión del analito de interés, y se mide la absorción por parte de la muestra que se analiza. El ingreso de la muestra requiere de varios procesos que se logran mediante atomizadores, de entre los cuales, los más comunes son flama (FAAS) y horno de grafito (GF-AAS), los cuales permiten la descomposición térmica de la matriz hasta lograr que los átomos se encuentren en su estado fundamental en estado gaseoso [90].

En la AES se utiliza una fuente de excitación-atomización para que los átomos contenidos en la matriz produzcan directamente la emisión a sus longitudes de onda características de cada elemento, esto se traduce en un análisis multielemental pudiendo analizar una gran cantidad de longitudes de onda de emisión producidas por el analito y así, determinar varios elementos de manera simultánea en cada corrida del análisis, a diferencia de las técnicas con lámpara de cátodo hueco de AAS en las que se puede analizar un único elemento por cada análisis [90]. El proceso de atomización-excitación más común en las configuraciones comerciales de AES es mediante plasmas, como por ejemplo el plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) o el plasma sostenido por microondas (MP-AES). El uso del ICP fue desarrollado originalmente en los años 60s, lo cual amplió la capacidad de medir rápidamente múltiples elementos en una misma corrida, y posteriormente su uso se amplió como fuente de atomización-ionización en el uso de espectrometría de masas atómica (ICP-MS) [91], la cual mostró una capacidad asombrosa para la cuantificación de elementos a límites de detección considerablemente más bajos que otras técnicas, con la subsecuente ventaja de tener la capacidad de separar y cuantificar múltiples isótopos de cada elemento [3].

Cada una de las diferentes configuraciones de espectrómetros atómicos presentan ventajas y desventajas, por ejemplo los atomizadores de flama utilizan por lo regular mezclas de aire-acetileno, o en otras aplicaciones en las que se requiere mayor temperatura en la flama se utilizan mezclas de óxido nitroso-acetileno [77], las cuales representan un riesgo al tratarse de gases inflamables u oxidantes, y aunque es una técnica simple y rápida, existen interferentes espectrales y no-espectrales, como lo son matrices con baja disociación que produzcan espectros de absorción anchos provocados

por la dispersión de partículas sólidas pequeñas, o por la ineficiente nebulización de muestras viscosas; aunque esto puede ser mejorado con el horno de grafito, en el cual es posible eliminar el solvente y poder utilizar una mayor cantidad de matriz [91]. A pesar de ser de bajo costo, la mayor limitante de FAAS es el análisis de un único elemento por cada corrida y un poder de cuantificación relativamente más bajo comparado con otras técnicas espectrométricas. El ICP-OES brinda una gran capacidad para analizar múltiples elementos de forma simultánea, de manera rápida y con grandes rendimientos de muestra, es decir la optimización de la cantidad de muestra utilizada para llevar a cabo el análisis [90]; el ICP es capaz de eliminar interferencias no espectrales que pueden ocurrir en AAS, y además, ICP-OES presenta un rango dinámico de trabajo mucho más amplio que las metodologías de AAS. ICP-MS conserva las ventajas de ICP-OES, y utilizando detección por MS, permite límites de detección más bajos, un rango analítico más amplio, e información isotópica con potencial para la denominación de origen geográfico en productos alimenticios [89]. La principal desventaja de ICP-MS es el alto costo, que es incluso mayor con respecto a su contraparte ICP-OES, además de existir diversos tipos de interferencias espectrales, como lo son estructuras poliatómicas, óxidos y elementos con dobles cargas formados en el plasma, que coinciden con diversos isótopos de elementos de gran interés para el análisis multielemental [91].

De manera relativamente reciente, Agilent Technologies puso en comercialización un espectrómetro de emisión atómica, con excitación/ionización en un plasma de microondas (MP-AES), este instrumento tiene la capacidad de sostener el plasma mediante un flujo constante de nitrógeno, y mantiene las ventajas de la emisión atómica, lo cual representa una tecnología rentable en análisis multielementales en comparación con sus contrapartes ICP-MS e ICP-OES. Este instrumento fue utilizado para realizar experimentos de foodómica en este trabajo, en primer lugar, con la finalidad de garantizar la seguridad en alimentos, pues se desarrolló una tecnología para cuantificar y separar en muestras de tortilla mexicana, arsénico inorgánico (iAs), que representa la forma más tóxica del As. Por otro lado, se implementaron metodologías de cuantificación multielemental en presencia de matriz para el análisis de vinos mexicanos para su posterior modelaje mediante análisis de componentes principales y realizar una denominación de origen.

4.3. Caso 1: Arsénico en tortillas de maíz

4.3.1. Contaminación y toxicidad del arsénico

Los niveles de As en el ambiente son variables y los compuestos de este elemento pueden estar presentes en aire, agua, suelos, vegetales y animales [92]. Entre los compuestos de As, se han identificado más de 60 especies químicas [93], de las cuales destacan las formas inorgánicas As(III) y As(V) (cuya suma representa el iAs-arsénico inorgánico), las especies metiladas monometil arsénico (V) (MMAs(V)), dimetil arsénico(V) (DMAs(V)), trimetil arsénico(V) (TMAO) y el ion tetrametil arsénico (TMA^+), arsenocolina (AC), arsenobetaina (AB), arsenoazúcares y arsenolípidos [94]. Dado que el As se acumula en el cuerpo humano, la exposición crónica puede resultar en su demostrado papel en la oncogénesis debido a que los compuestos con As presentan afinidad a grupos tiol y pueden sustituir el fósforo en reacciones biológicas inhibiendo la replicación del ADN y procesos metabólicos [95].

No todos los compuestos de As son igualmente tóxicos, y por consiguiente la medición de As total en los productos alimenticios no necesariamente refleja su potencial de riesgo [96]. Los valores de

dosis letales medias en ratones para algunas especies de As demuestran que el arsénico inorgánico (iAs = As(III + As(V)) es la forma más tóxica, y su grado de toxicidad de otras especies se presenta de la siguiente manera: iAs > MMAs(V) > DMAs(V) > As-colina > As-bteaína [97].

4.3.2. Problemática del As en productos derivados de cereales

El arsénico puede ingresar al organismo humano por consumo directo de agua contaminada por As, alimentos contaminados con As [98] o por cultivos vegetales y derivados de estos, especialmente aquellos que hayan sido regados con agua proveniente de mantos acuíferos expuestos a este tóxico [99].

Los productos a base de cereales constituyen una fuente potencial de As en la dieta, sobre todo en regiones geográficas en las que existen de forma natural o por contaminación, altas concentraciones de este elemento [100]. De esta forma, la captación de As, su translocación, distribución y especiación en raíces, tallos, hojas y granos han sido investigados ampliamente en una gran cantidad de cultivos tales como arroz, trigo y maíz [101-107]. Los posibles efectos por el procesamiento de granos sobre la biodisponibilidad y especiación del As en productos alimenticios elaborados a base de arroz o trigo ha sido un tema abordado en varios estudios [93, 108-113], mientras que la información de la especiación de As en productos alimenticios a base de maíz es escasa. Por esta razón, en esta parte del trabajo se puso a punto una metodología para la separación y cuantificación de As mediante SPE-HG-MP-AES en siete muestras de tortillas de maíz, una muestra de arroz y tres muestras de agua de grifo. Cabe señalar que el tema de As en tortilla forma una continuación del proyecto de maestría, pero se incluye aquí debido a que los resultados de dicha continuación contribuyeron de manera sustancial en la publicación del artículo en la revista Analytical Methods de la editorial Royal Society of Chemistry (impact factor 2.38).

4.3.3. Objetivos

Poner a punto una metodología de determinación de tAs e iAs mediante HG-MP-AES.

4.3.3.1. Objetivos específicos:

- Ajustar las condiciones adecuadas para analizar As en tortillas utilizando Te(IV) como estándar interno mediante HG-MP-AES.
- Evaluar las condiciones adecuadas para llevar a cabo la extracción de As en tortillas.
- Evaluar las condiciones adecuadas de amortiguador de pH para cargar en cartucho, cantidad de muestra, tipo de cartucho, y eluyentes para realizar la separación de iAs mediante SPE offline.
- Ajustar las condiciones necesarias para analizar iAs en tortillas y en muestras de agua mediante HG-MP-AES.

4.3.4. Materiales y métodos

4.3.4.1. Equipos analíticos

Se utilizó un espectrómetro de emisión atómica con plasma de microondas sostenido por nitrógeno (Agilent MP-AES 4100) controlado por el software MP-expert (actualizado del MP-AES 4200) utilizando una cámara de Sistema de Introducción de Muestras Múltiples (MSIS) especializada para llevar a cabo el proceso de generación de hidruros (HG).

4.3.4.2. Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Se utilizó agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco). Las soluciones estándar de As: arseniato dibásico de sodio (As(V)), trióxido arsénico (As(III)) fueron preparados disolviendo las cantidades adecuadas en agua para tener una solución con una concentración de 1 000 µgAs mL⁻¹. También se preparó una solución de telurito de potasio (Te(IV)) a una concentración de 1 000 µg Te mL⁻¹.

Se utilizaron los siguientes reactivos marca Sigma: ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido ascórbico, peróxido de hidrógeno, nitrato de amonio, fosfato de amonio dibásico, hidróxido de amonio, tris base, nitrato de plata, yoduro de potasio, cloruro de sodio. Se utilizó una solución de estándares internos Agilent Technologies: In, Y, Bi, Rh, 2 mg L⁻¹; Sc, 5 mg L⁻¹; Li, 10 mg L⁻¹.

Para la extracción en fase sólida se utilizaron cartuchos Supelco-Select SAX de intercambio aniónico fuerte (200 mg/6 mL).

Las muestras de tortilla (T1 – T7) fueron compradas durante el verano del 2015 en mercados seleccionados aleatoriamente de ciudades del estado de Guanajuato. Previo al almacenamiento, se liofilizaron 100 g de cada muestra y fueron homogenizadas mediante pistilo y mortero. Se incluyó una muestra de arroz (R1) para fines comparativos y tres muestras de agua de grifo (W1-W3) que representa una matriz menos compleja para el ajuste de los parámetros instrumentales.

4.3.4.3. Determinación de As total en tortillas mediante HG-MP-AES

Para este proceso, se pesaron 500 mg de cada muestra de tortilla (liofilizada y homogenizada) en tubos de vidrio, agregando 50 µL de telurito de potasio (25 mgTe L⁻¹) como estándar interno (IS) y 2 mL de HNO₃ 69 % v/v. Las muestras se realizaron por triplicado y cada una fue calentada durante 5 min a 80 °C, y posteriormente a 120 °C durante 3 h. Una vez centrifugadas se tomaron 1.6 mL de cada muestra y fueron diluidas a 3 mL con agua desionizada, además se agregaron 550 µL de una solución reductora (KI 36 % p/v; ácido ascórbico 3.6 % p/v) y también 1.45 mL de HCl concentrado. Para el análisis de agua de grifo se tomaron 3 mL de muestra y de igual forma al procedimiento anterior, se agregó Te como IS y la solución reductora descrita. Las soluciones utilizadas para la calibración contenían 150 µgTe L⁻¹ y las siguientes concentraciones de As: 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µgAs L⁻¹ con un volumen total de 5 mL.

Las soluciones fueron analizadas mediante HG-MP-AES. Para ello, se utilizó una cámara de introducción de muestras múltiple (MSIS), en la cual, con la ayuda de la bomba peristáltica del MP-AES y mangueras conectadas a la cámara MSIS, se transportaron las muestras o estándares por la parte inferior de la cámara, el agente reductor (NaBH₄ 2 % p/v + NaOH 0.3 % p/v) se transportó a través de la parte superior de la cámara y el gas de nebulización (N₂) fue introducido

perpendicularmente. Para la acidificación de las muestras y estándares y poder llevar a cabo la HG se utilizó HCl 8 mol L⁻¹, el cual fue introducido junto con el flujo de las muestras/estándares mediante una conexión tipo T (Fig. 2.1).

La generación de hidruros y las condiciones de operación instrumental se enlistan en la Tabla 2.1. Para realizar cálculos de porcentaje de recuperación se realizó un experimento en tortilla, en el cual a cada muestra se agregaron 100 ng de As (se añadieron 100 µL de una solución patrón de As(V) a una concentración de 1 mgAs L⁻¹) previo al proceso de digestión. Esto equivale a un enriquecimiento de 200 µgAs kg⁻¹ de tortilla liofilizada, o a un aumento de 16 µgAs L⁻¹ en las soluciones introducidas y analizadas mediante HG-MP-AES.

Tabla 2. 1: Condiciones de operación instrumental del sistema HG-MP-AES

Generación de hidruros	
Acidificación ^(a)	HCl 8 mol L ⁻¹ , 1 mL min ⁻¹
Generación de hidruros ^(a)	NaBH ₄ 2% m/v + NaOH 0.3% m/v, 1 mL min ⁻¹
Detección en MP-AES	
Presión de nitrógeno	140 psi
EGCM (módulo de control de gas externo) ^(b)	Medio
Cámara de nebulización	MiraMist Teflon®/Sistema de introducción de muestras múltiple (MSIS: multimode sample introduction system)
Presión de nebulización	240 kPa
Posición de vista	-20
Modo de adquisición	Continuo
Tiempo de integración	3s
Longitudes de onda de detección	228.812 nm (As), 214.281 nm (Te)
Corrección de fondo	Off-peak left+right
Número de pixeles	3

(a) - Estas soluciones se transportaron mediante la bomba peristáltica del MP-AES

(b) - Módulo de control de gas externo (EGCM) para inyección de aire en la cámara y antorcha para evitar deposiciones orgánicas

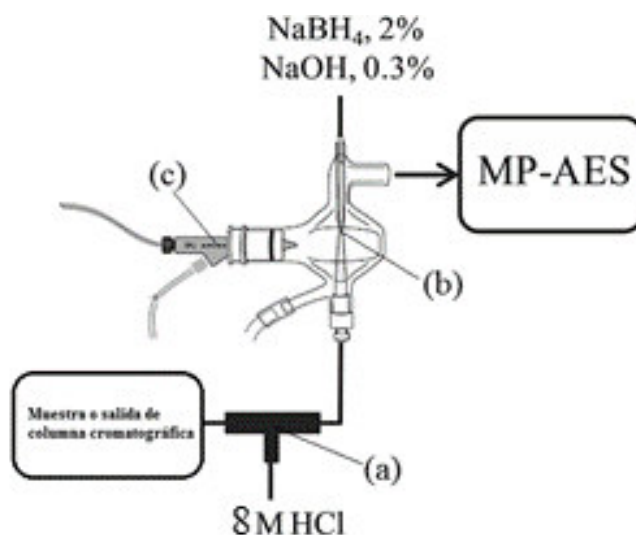


Fig. 2. 1: Sistema de introducción de muestra para generación de hidruros (HG). (a) Conexión tipo T donde se unen los flujos de la muestra o estándares conectado con el flujo de HCl 8 mol L⁻¹. (b) Área de contacto entre agente reductor (NaBH₄) y muestra acidificada, para llevar a cabo la reacción de HG. (c) Nebulizador Miramist.

4.3.4.4. Separación/preconcentración de iAs mediante extracción en fase sólida con detección por espectrometría de emisión atómica con plasma sostenido por microondas (SPE-HG-MP-AES)

Se realizó una modificación a cartuchos de intercambio aniónico fuerte Supel-Select SAX como reporta Issa et al. [114] con algunas modificaciones. Utilizando una bomba Eldex A-30-S, se pasó a través de los cartuchos un flujo de 20 mL de HNO₃ 0.1 % (16 mmol L⁻¹) y 20 mL de agua desionizada a un flujo de 1 mL min⁻¹, seguido de 20 mL de una solución de NaCl 1 mol L⁻¹, 20 mL de AgNO₃ 50 mmol L⁻¹ y 15 mL de HCl 0.1 % v/v (28 mmol L⁻¹). Posteriormente los cartuchos fueron lavados con 20 mL de agua desionizada y se preconditionaron con 20 mL de Trizma base 100 mmol L⁻¹ (pH 9.5), obteniendo cartuchos de intercambio aniónico modificados con cloruro de plata (SAX-AgCl).

Para la extracción de As, se pesaron 2 g de tortilla liofilizada en tubos de vidrio, a los cuales se agregaron 20 mL de HNO₃ 0.06 mmol L⁻¹ y se calentaron a 95 °C durante 1.5 h. Las muestras se centrifugaron (3 000 g, 1 h), se tomaron 10 mL del extracto, se mezclaron con 20 mL de Trizma base 100 mmol L⁻¹ (pH 9.5) y esta solución fue cargada directamente en un cartucho modificado (SAX-AgCl) con ayuda de una bomba Eldex A-30-S. La calibración se llevó a cabo utilizando 30 mL de soluciones de As(V) a 0, 10, 20, 40, 60 y 80 µgAs L⁻¹ utilizando la misma concentración de Trizma base que la utilizada para las muestras. Para el análisis de agua, se diluyeron 10 mL de la muestra con 20 mL de Trizma base 10 mmol L⁻¹. Durante la siguiente etapa, se usaron 3 mL de ácido acético 35 mmol L⁻¹ para eliminar las especies orgánicas retenidas en el cartucho, y finalmente la fracción de iAs se eluyó utilizando 3 mL de HNO₃ 16 mmol L⁻¹ a un flujo de 1 mL min⁻¹. Se determinó el As

total en esta solución (el cual representa el iAs del extracto), tal y como se describe en la sección anterior.

4.3.5. Resultados y discusión

El maíz es el principal cultivo en México, y las tortillas de maíz son un alimento básico de nuestro país. En varias regiones de Guanajuato se han encontrado elevadas concentraciones de As en suelos, mantos acuíferos [115], así como en las plantas de maíz [116], por lo cual existe la necesidad de evaluar las tortillas como una posible fuente de As en la dieta. Para esto, se exploró la capacidad de HG-MP-AES para la determinación de As total y de iAs en tortillas.

4.3.5.1. Determinación de As total en tortillas

Debido a que el Te es un elemento formador de hidruros, posee una baja abundancia en la superficie de la tierra ($5 \mu\text{gTe kg}^{-1}$) y que además presenta bajas concentraciones reportadas en granos de cultivos ($0.75 - 2.5 \mu\text{gTe kg}^{-1}$) [117], en este trabajo se utilizó Te(IV) para ser examinado como un posible IS en la determinación de As por HG-MP-AES. Se determinó el Te en las muestras con las mismas condiciones que para As descritas en la sección 3.3.3.3 (rango de calibración $0-300\mu\text{gTeL}^{-1}$), y en ninguna de las muestras de tortilla (T1-T7), arroz (R1), ni de agua (W1) fue detectado este elemento, por lo cual fue utilizado como IS en la determinación de As mediante HG-MP-AES. El límite de cuantificación para el método de determinación de As en tortillas se basó en la calibración en presencia de matriz de muestra (extracto de la muestra T4 diluido 5 veces).

Se realizó también un procedimiento de adición de estándar agregando $16 \mu\text{gAs L}^{-1}$ previo al proceso de digestión descrito en la Sección 3.3.3.3, lo cual corresponde a un aumento de $200 \mu\text{gAs kg}^{-1}$ en la muestra. En tres réplicas independientes se obtiene $190 \pm 9 \mu\text{gAs kg}^{-1}$ en la muestra sin enriquecer y $392 \pm 15 \mu\text{gAs kg}^{-1}$ en la muestra posterior a la adición de estándar. Los valores promedio de porcentaje de recuperación son de 101 %, lo cual indica una precisión bastante aceptable.

Se realizó la cuantificación de As total de siete muestras de tortilla (T1-T7), una de arroz (R1) y tres muestras de agua de grifo (W1-W3) utilizando HG-MP-AES. Los resultados se presentan en la Tabla 2.2; se compararon con los resultados obtenidos previamente para las mismas muestras cuantificadas para As mediante ICP-MS. Los resultados se encuentran con una buena concordancia indicada por una comparación estadística de promedios, a un nivel de significancia $p < 0.05$.

A pesar de que HG-MP-AES presenta un LDC de $47.6 \mu\text{gAs kg}^{-1}$ menor al obtenido para ICP-MS ($9.9 \mu\text{gAs L}^{-1}$), las escasas normas de arsénico en alimentos, como en Brasil, a través del ministerio de agricultura, ganadería y abastecimiento, se establece que los alimentos marinos no deben sobrepasar 1 mg kg^{-1} de As total; en China la norma de niveles de contaminantes en comidas (GB 2762-20012) vigente desde el 2014, establece que los límites de As total en granos, vegetales frescos, productos fúngicos, carnes, leche en polvo, aceites, condimentos, azúcar, almidón, cocoa, chocolates, dulces, no debe sobrepasar de 0.5 mgAs kg^{-1} , en leche y aceites no debe sobrepasar de $0.1 \text{ mg As kg}^{-1}$, niveles de cuantificación de tAs que se pueden detectar con la metodología de HG-MP-AES propuesta en este trabajo.

Tabla 2. 2: Concentración de As total (tAs) en distintas muestras reales mediante el método propuesto de HG-MP-AES comparado con resultados previos evaluados mediante ICP-MS. (Se muestran los valores promedio \pm DE en $\mu\text{gAs L}^{-1}$ para tortillas (T1-T7), una muestra de arroz (R1))

Muestra	HG-MP-AES	ICP-MS
T1	190 \pm 9	192 \pm 4
T2	< LDC	44.1 \pm 4.2
T3	56.2 \pm 3.1	52.0 \pm 0.4
T4	< LDC	21.8 \pm 0.7
T5	88.0 \pm 1.2	85.4 \pm 0.8
T6	< LDC	38.4 \pm 0.7
T7	48.7 \pm 3.5	50.1 \pm 0.8
R1	118 \pm 5	120 \pm 7
W1	20.4 \pm 1.2	21.9 \pm 0.6
W2	23.3 \pm 1.7	24.3 \pm 0.5
W3	20.9 \pm 1.5	19.3 \pm 0.8

4.3.5.2. Puesta a punto de la separación/preconcentración de iAs mediante SPE-HG-MP-AES

Con la finalidad de establecer un procedimiento de separación/preconcentración de iAs en muestras reales, inicialmente en el presente proyecto se realizaron experimentos con SPE, en los cuales se cargaron en los cartuchos 5 mL de estándar de As(V) a concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{gAs L}^{-1}$ en presencia de MMAs(V) y DMAs(V), ambos a una concentración de 100 $\mu\text{gAs L}^{-1}$ y diluidos en Trizma base 100 mmol L^{-1} ; posteriormente se determinó el As en las fracciones colectadas de HNO_3 mediante HG-MP-AES, obteniendo un porcentaje de recuperación del 36.4 %. Es importante mencionar que en el caso de estándares no-acidificados, se requiere una concentración de Trizma base 10 veces menor para obtener un pH de 9, y al realizar esto, se obtienen porcentajes de recuperación no menores del 93 %. Estos resultados indican que el aumento de fuerza iónica (debido a la presencia de ácido y de la solución amortiguadora) desfavorece la retención de iAs, concordando con reportes previos [118]. Con el objetivo de disminuir la concentración total de sales y mantener el pH a 9, se usaron distintas soluciones para examinar la retención de iAs en los cartuchos modificados; las soluciones que se examinaron fueron soluciones amortiguadoras de fosfatos, boratos y carbonatos, cada una de ellas en un rango de concentración de entre 10 y 100 mmol L^{-1} , sin embargo, los porcentajes más altos de recuperación de As continuaron obteniéndose al utilizar Trizma base. En estas condiciones, la separación de los cartuchos permaneció sin modificarse al usarse al menos 20 veces, con un coeficiente de variación del 5.2 % para 5 réplicas no sucesivas. Con la finalidad de explorar la factibilidad de preconcentrar As(V) en soluciones ácidas ajustadas a pH 9 con Trizma

base 100 mmol L⁻¹, se cargaron distintas alícuotas en los cartuchos SAX-AgCl, cada una con distintos volúmenes (5, 8, 15, 25 y 50 mL) pero con la misma cantidad de As (500 ng de As(V)) y en presencia de 150 ng de DMAs(V) y MMAs(V) cada una. Los porcentajes de recuperación de iAs obtenidos para estas muestras cargadas en los cartuchos SAX-AgCl, fueron 34.1 %, 37.7 %, 32.5 %, 37.3 % y 39.6 % para las alícuotas de 5, 8, 15, 25 y 50 mL, respectivamente, demostrando la viabilidad de llevar a cabo una preconcentración. Para los análisis posteriores se eligió utilizar 30 mL de muestra, como se describe en la Sección 3.3.3.4. Un resumen de los principales parámetros analíticos obtenidos tanto para SPE-HG-MP-AES como para SPE-ICP-MS, se muestran en la Tabla 2.3; a pesar de que el volumen de las soluciones de calibración se redujo 6 veces durante el proceso de SPE (30 mL de muestra recuperados en 3 mL de la fracción eluida como la fracción de iAs + 2 mL de mezcla de pre-reducción), debido a la baja eficiencia de retención, el factor de preconcentración logrado fue de alrededor de 2.

Tabla 2. 3: Parámetros analíticos típicos evaluados para la determinación de iAs mediante SPE acoplado “off-line” en HG-MP-AES o en ICP-MS y los resultados obtenidos en las muestras de T1 y W2.

Parámetro	SPE – HG-MP-AES	SPE – ICP-MS
Intervalo de calibración, µgAs L ⁻¹ (1)	0; 10; 20; 40; 80	0; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0; 10
Función de regresión lineal	$S_{As}/S_{Te}=(6.480 C -5.17)\cdot 10^{-2}$	$S_{As}/S_{Rh}=(7.312 C +0.16)\cdot 10^{-3}$
Error estándar de la pendiente	$2.15\cdot 10^{-3}$	$1.76\cdot 10^{-4}$
Error estándar del intercepto	$4.36\cdot 10^{-2}$	$0.24\cdot 10^{-3}$
r ²	0.9897	0.9957
LOD instrumental, µgAs L ⁻¹	0.9	0.012
LDC instrumental, µgAs L ⁻¹	3.1	0.042
CV, % (2)	6.2	3.4
LDC del método, µgAs kg ⁻¹ (3)	95	12.6
LDC del método, µgAs L ⁻¹ (4)	11.2	0.28
T1, promedio ± DE, µgAs kg ⁻¹	< LDC	139 ± 12
% Recuperación de T1 (5)	28.7	73.4
W1, promedio ± DE, µgAs L ⁻¹	16.8 ± 1.9	17.7 ± 1.2
% Recuperación de W1(5)	93.2	97.8

(1) - concentraciones en las soluciones ingresadas en SPE (30 mL; 0.06 M HNO₃, 100 mM Trizma base para HG-MP-AES; 10 mM Trizma base para ICP-MS); (2) – coeficiente de varianza evaluado para cinco réplicas sucesivas del estándar de calibración de menor concentración; (3) – LDC expresado para tortilla liofilizada; (4) – LDC para análisis de agua, las soluciones de calibración contenían 10 mM Trizma base; (5) - 1.0 µg de As como As(V) agregado a la muestra; C - concentración de As(V) en µgAs L⁻¹; CV – coeficiente de varianza evaluada para cinco réplicas sucesivas de un estándar de As(V) 20 µgAs L⁻¹.

4.3.5.3. Aplicación de SPE-HG-MP-AES en muestras reales

Para este estudio se eligió la muestra con la mayor concentración de iAs (T1). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.3 y se puede observar que la concentración de iAs en la muestra T1 es menor que el límite de cuantificación del sistema “off-line” SPE-HG-MP-AES. Posterior a la adición de estándar (1.0 μg de As como As(V)), el porcentaje de recuperación no fue satisfactorio (28.7 %). Esta disminución en la capacidad de retención fue atribuida a que la alta concentración de sales, así como la matriz química de la tortilla, deterioraron los cartuchos SPE-AgCl. Para disminuir el efecto de matriz, se optó por utilizar ICP-MS para llevar a cabo la cuantificación en 1 mL de un extracto de tortilla, se ajustó a pH 9 utilizando Trizma base 10 mmol L⁻¹ en un volumen final de 30 mL. Los principales parámetros analíticos obtenidos en “off-line” SPE-ICP-MS se presentan en la Tabla 2.3, junto con los resultados obtenidos para el extracto de la muestra T1.

Como era de esperarse, al utilizar una cantidad menor de extracto y concentraciones de buffer diez veces menores, los resultados fueron claramente mejorados, obteniendo un porcentaje de recuperación de iAs del 75 %. Para analizar la funcionalidad de SPE en el análisis de sistemas químicamente menos complejos, se analizaron muestras de agua (W1), en el cual, las soluciones de calibración y las muestras contenían Trizma base 10 mmol L⁻¹; en el método con adición de estándar, las dos técnicas proporcionaron porcentajes de recuperación del 93.2 y del 97.8 %, respectivamente, con lo cual se comprueba que la complejidad química de la matriz de tortillas desfavorece la eficiencia de retención de As en los cartuchos SAX-AgCl.

4.3.6. Conclusiones

En esta parte del trabajo se realizó la determinación de arsénico total (tAs) e inorgánico (iAs) en tortillas. Se ha propuesto un nuevo procedimiento de bajos costos para la determinación de As total, basado en generación de hidruros en espectrometría de emisión atómica con plasma de nitrógeno sostenido por microondas. Se añadió en el análisis la aplicación de Te como estándar interno, para obtener las ventajas de IS como lo son la mejora en la precisión mediante la corrección de errores aleatorios, pero también para mejorar el límite de detección, comparado con procedimientos sin el uso de IS. El análisis de As total realizado en muestras de tortilla mediante el procedimiento desarrollado en este trabajo (HG-MP-AES) proporcionó datos consistentes con los resultados del análisis de las mismas muestras realizado previamente mediante ICP-MS. El objetivo de esta parte del proyecto fue utilizar la capacidad de la técnica HG-MP-AES incorporando la extracción en fase sólida (SPE) de manera “off-line” para la separación/preconcentración de iAs utilizando Te(IV) como IS. Se utilizaron cartuchos de intercambio aniónico fuerte modificados con cloruro de plata, requiriéndose un pH 9 para la retención eficiente del iAs. De entre varias soluciones amortiguadoras agregadas a los extractos de tortilla (HNO₃ 0.06 mol L⁻¹, 95 °C, 90 min), Trizma base 100 mmol L⁻¹ fue la solución más apropiada. La recuperación de iAs de los cartuchos fue moderadamente baja para estándares de As(V) (< 40 %), mientras que para tortillas fue inaceptablemente baja (28.7 % de la cantidad de As(V) agregada a la tortilla). Este efecto deteriorativo fue atribuido a una concentración relativamente alta de sales y a una composición compleja de la matriz. En efecto, una vez que se disminuyó la cantidad de muestra y la concentración de Trizma cargados en los cartuchos, la recuperación de iAs aumentó a 73.4 %. El procedimiento de SPE resultó ser apropiado para la separación/preconcentración de iAs en agua natural, que es una muestra de composición química mucho más simple. Se debe remarcar que los estudios llevados a cabo con SPE para la determinación

de iAs en granos o en productos derivados de éstos son muy pocos en comparación con otro tipo de muestras, y que los resultados obtenidos aquí podrían ser de gran utilidad en desarrollos futuros de técnicas similares, especialmente porque SPE conlleva diversas ventajas en cuanto a simplicidad de operación, pocos requerimientos de reactivos y solventes, y con un costo mucho menor a otras técnicas.

4.4. Caso 2: Elementos mayoritarios y minoritarios en vinos mexicanos y su potencial en la evaluación de procedencia de vinos

4.4.1. Elementos minerales en vino de mesa

La evaluación de los perfiles de elementos mayoritarios, trazas y ultratrazas en vinos se ha llevado con diferentes enfoques. Los factores que más influyen el estatus de metales/metaloides en vinos incluyen la composición del suelo específica de cada lugar, los requerimientos nutricionales y la captación por la vid, las técnicas de cultivo así como los aditivos utilizados en la posterior elaboración y maduración de los vinos [119]. Los elementos encontrados en vinos han sido clasificados como mayoritarios, los cuales pueden llegar a tener $> 10 \text{ mg L}^{-1}$ (Na, Mg, K, Ca), traza que pueden estar en el intervalo de $0.1 - 1.0 \text{ mg L}^{-1}$ (B, Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr, Rb, Ag, Cd, Sn, Sb, Ba, Hg, Tl, Pb, etc.) y ultra-traza que pueden encontrarse a $< 100 \mu\text{g L}^{-1}$ [120]. Estos niveles concuerdan con la premisa aceptada que plantea que el consumo moderado de vino proporciona elementos esenciales, principalmente Cu, Zn y Fe [121]. Por otro lado, la susceptibilidad de ser contaminado con elementos tóxicos durante el crecimiento de la planta y durante la elaboración/maduración del vino deben contemplarse como efectos adversos [82]. Algunos elementos son de gran relevancia para las propiedades sensoriales de los vinos, como es el caso del Al, Ca, y Na, los cuales se encuentran presentes en agentes floculantes [122]. El K también es un elemento de gran interés abundante en vinos, pues está implicado en el control del pH por el ácido tartárico [123]. Algunos elementos con propiedades redox como el Fe y Cu, pueden afectar el equilibrio redox y así afectar el sabor y la apariencia, y también contribuir a las propiedades antioxidantes de los vinos [124]. Los vinos con un perceptible sabor salino se caracterizan por concentraciones relativamente altas de Na, K, Mg y Ca [125] y el Mg y el Ca son necesarios para una eficiente fermentación [126]. Debido a todos estos aspectos, se reafirma que la determinación de metales/metaloides en vinos es de gran relevancia y además podría dar pistas acerca de la proveniencia de los vinos. En esta parte del trabajo, se utilizaron dos metodologías de desarrollo relativamente reciente para la cuantificación de elementos: método de dilución estándar (SDA) y calibración multi-energía (MEC). Además de las anteriores, las metodologías de calibración externa (EC) y adición de estándar (SA), descritas ampliamente en la literatura, fueron utilizados en conjunto con espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MP-AES) para la realización de la determinación de elementos mayoritarios y minoritarios en vinos de tres regiones distintas de México (Valle de Guadalupe, estado de Baja California; estado de Aguascalientes, y provenientes del estado de Guanajuato). Para ello, se analizó el perfil de metales para realizar un modelo por análisis de componentes principales (PCA) que permitiera la separación estadística con base a estos resultados de la proveniencia de las muestras de vinos.

4.4.2. Revisión de la metodología utilizada: análisis por dilución de estándar (SDA)

El análisis de dilución de estándar (SDA), es un método de cuantificación desarrollado por Jones et al [127], el cual consiste en la adquisición de las señales de emisión de elementos en tiempo real para

monitorear los cambios debidos a la dilución, de tal manera que se obtiene una gráfica de dichos cambios con respecto al tiempo que presenta una pendiente negativa, la cual, por la naturaleza de la adquisición de señales y dependiendo del tiempo de integración, está compuesta de una serie de puntos que son tomados de forma análoga a los puntos de una calibración (Fig. 2.2)

Específicamente el método requiere de tres contenedores que serán leídos de manera continua en un espectrómetro de emisión atómica:

- a) Solución Blanco (SB): consiste en un blanco, usualmente para espectrometría atómica HNO_3 al 1 %
- b) Solución 1 (S1): La muestra en cuestión diluida al 50 % con HNO_3 al 2 % con una adición de estándares de analitos que se desean cuantificar a una concentración conocida, además de un estándar interno
- c) Solución 2 (S2): La muestra en cuestión diluida al 50 % con HNO_3 al 2 %

El primer paso del análisis, consiste en realizar la lectura en tiempo real de la SB utilizando un espectrómetro de emisión atómica para monitorear a las distintas líneas de emisión para cada uno de los elementos que se desean cuantificar, proceso que sirve para estabilización del plasma y de las señales (Fig. 2.2 región a). Una vez que las señales no presentan ninguna fluctuación, se reemplaza el recipiente de la SB, y se inicia la lectura directa del recipiente que contiene la S1. En este proceso las señales de cada longitud de onda comienzan a aumentar, debido a la contribución del analito presente en la muestra más la contribución que representa la adición de estándares realizada en este recipiente; se monitorean las señales de este recipiente hasta que lleguen a una meseta gráfica, y permaneciendo estable durante un período considerable de tiempo (Fig. 2.2 región b). Una vez que las señales alcanzan una estabilidad, se procede a verter el contenido del recipiente de la S2 al recipiente con S1 sin dejar de monitorear las líneas de emisión en el recipiente que contiene la S1; durante este proceso ocurre una dilución de los analitos, puesto que la S2 no contiene la adición de los estándares a analizar, y las señales de los analitos inician un proceso de descenso debido a la dilución, este proceso da como resultado una pendiente negativa en la gráfica del método de SDA (Fig. 2.2 región c), y los puntos que forman dicha pendiente se toman para realizar el subsecuente proceso algebraico para realizar la cuantificación de los analitos. Este proceso de dilución posee una gran ventaja, puesto que todo el análisis se lleva a cabo sin ningún cambio en la composición de la matriz, puesto que al verter 50 % de muestra en un recipiente cuya composición es también del 50 % de la matriz, la matriz permanece intacta (así como lo es la concentración del(los) analito(s)). Además, se agrega un estándar interno para evitar posibles errores aleatorios, controlando el proceso de dilución y posibles fluctuaciones en el plasma.

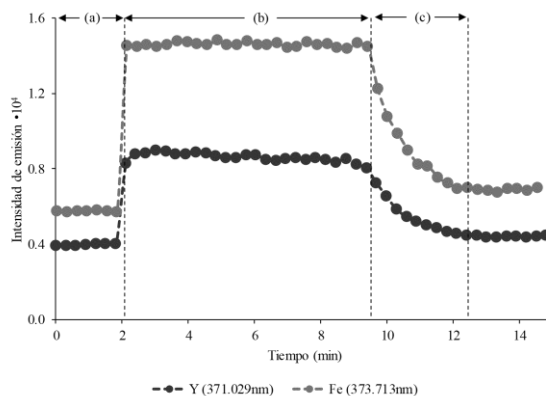


Fig. 2. 2: Diagrama típico de adquisición durante SDA (ejemplo del caso de Fe (373.713 nm) e Y (371.029 nm) en vinos mediante MP-AES). (a) Monitoreo de la señal de un blanco (SB). (b) Monitoreo de la S1, con un contenido de la muestra de vino diluido 1:1 con HNO₃ 2 % y con adición de estándares (ejemplo Fe) y estándar interno (Y) (c) Monitoreo de la S1 al verter la S2, produciéndose una disminución de las señales debido a la dilución provocada por el hecho que la S2 es la muestra sin adiciones de estándar.

Posterior a este proceso, se toma cada uno de los puntos de la región mostrada en la Fig. 2.2 como la región c. La forma en la que se construye la curva de calibración es presentando en el eje X los valores inversos de la concentración del estándar interno ($1/[IS]$), la cual se calcula utilizando los valores de la concentración inicial del IS y final, para luego asignar los valores de dilución con respecto al tiempo en el que se llevó la dilución para cada uno de los puntos en la región SDA (Fig. 2.2 región c); y en el eje Y se presentan los valores de la relación de la intensidad de la señal del analito en cuestión entre la intensidad de la señal del estándar interno (Int_A / Int_{IS}) representado para cada punto en la región de la dilución.

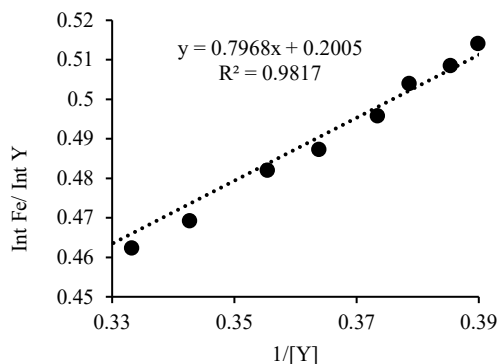


Fig. 2. 3: Calibración típica de SDA analizada para Fe en vinos mediante MP-AES, utilizando los puntos de la Fig. 2.2 región c y los valores de las concentraciones de la dilución del IS.

Cabe mencionar que este proceso se repite de la misma manera para cada uno de los analitos que serán cuantificados en la muestra y obtener así las curvas de calibración para cada caso en particular. En la Fig. 2.3 se presenta un ejemplo de este proceso de calibración. Finalmente, para llevar a cabo el cálculo de la concentración de cada analito se realiza la sustitución de los valores requeridos en la siguiente Ecuación (Ec. 1):

$$C_A^M = \frac{m}{b} \cdot \frac{C_A^{est}}{C_{IS}} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde C_A^M es la concentración del analito en la muestra, m y b son la pendiente y el intercepto, respectivamente de la curva de calibración trazada (Fig. 2.3), C_A^{est} y C_{IS} son las concentraciones del analito y estándar interno, respectivamente, agregados en la S1.

El fundamento de la Ec.(1) parte de la premisa de la proporcionalidad directa que existe entre la intensidad de la señal de un analito y su concentración, estas se encuentran relacionadas entre sí por una constante de proporcionalidad que en el caso de las funciones lineales está dada por la pendiente de una recta (m), esto se cumple tanto para el analito en cuestión como para el estándar interno, expresado en las ecuaciones Ec. (2) y Ec. (3)

$$Int_A = m_A \cdot [C_A] \quad \text{Ec. 2}$$

$$Int_{IS} = m_{IS} \cdot [C_{IS}] \quad \text{Ec. 3}$$

Considerando además que la señal producida para el analito en el método SDA en la S1 (Muestra + Estándar) es una contribución de la concentración de analito contenida *per se* en la muestra [C_A^M] y la concentración añadida de estándares [C_A^{est}], entonces se puede describir la siguiente ecuación:

$$[C_A] = [C_A^M] + [C_A^{est}] \quad \text{Ec. 4}$$

El proceso matemático parte de iniciar dividiendo la Ec.2 sobre la Ec. 3 para obtener la Ec. 5

$$\frac{Int_A}{Int_{IS}} = \frac{m_A C_A}{m_{IS} C_{IS}} \quad \text{Ec. 5}$$

Posteriormente se sustituye la Ec. 4 en la Ec. 5 y reacomodando términos se obtiene la Ec. 6

$$\frac{Int_A}{Int_{IS}} = \frac{m_A (C_A^M + C_A^{est})}{m_{IS} C_{IS}} = \frac{m_A C_A^M}{m_{IS} C_{IS}} + \frac{m_A C_A^{est}}{m_{IS} C_{IS}} \quad \text{Ec. 6}$$

La final Ec. 6 es una función lineal que asocia la concentración de analito con las intensidades obtenidas para el analito y para el estándar interno y se puede hacer una analogía con la forma de la ecuación de calibración del tipo $y = m \cdot x + b$ considerando lo siguiente:

$$y = \frac{Int_A}{Int_{IS}} \quad x = \frac{1}{C_{IS}} \quad \text{pendiente} = \frac{m_A C_A^M}{m_{IS}} \quad \text{intercepto} = \frac{m_A C_A^{est}}{m_{IS} C_{IS}}$$

Resumiendo, al graficar el inverso de C_{IS} vs la relación de señales entre analito y estándar interno (Int_A / Int_{IS}) y realizando el proceso de regresión lineal, se obtienen los valores de pendiente (m) y de intercepto (b), que representan las ecuaciones anteriores.

En el siguiente paso, para conocer la concentración del analito en la muestra problema [C_A^M], se divide la pendiente entre el intercepto, y eliminando los términos iguales se obtiene lo siguiente:

$$\frac{\text{pendiente}}{\text{intercepto}} = \frac{\frac{m_A C_A^M}{m_{IS}}}{\frac{m_A C_A^{est}}{m_{IS} C_{IS}}} = \frac{\cancel{m_A} C_A^M}{\cancel{m_A} C_A^{est}} = \frac{C_{EI} C_A^M}{C_A^{est}} \quad \text{Ec. 7}$$

El corolario de todo lo anterior y despejando la concentración de analito en la muestra $[C_A^M]$ en la Ec. 7 se obtiene la Ec. 1, utilizada para llevar la cuantificación de un analito mediante este método.

4.4.3. Revisión de la metodología utilizada: calibración multi-energía (MEC)

Otro método utilizado para la cuantificación de elementos en vinos mediante el uso de MP-AES fue la calibración multienergía (MEC) la cual fue desarrollada por Virgilo et al [128] y se basa en la adquisición de las señales analíticas de dos soluciones por separado, la primera que consta de la muestra con adición del o los estándares a cuantificar diluida 1:1 (M+S), y la segunda que consta únicamente de la muestra diluida 1:1 con un blanco (M+B), ambas soluciones son analizadas a distintas longitudes de onda de emisión, correspondientes a las líneas espectrales características de cada elemento. Cada una de las líneas espectrales presentan distintas intensidades, debido a que la transición de energía, la probabilidad y la degeneración del estado excitado son específicos para cada transición permitida; sin embargo, la relación entre las magnitudes de las señales a cada longitud de onda es siempre proporcional a la relación de las concentraciones del analito en ambas soluciones. Por lo tanto, la concentración de un analito en la muestra puede ser calculada conociendo las concentraciones de estándar agregado y utilizando la pendiente de la función de regresión lineal construida a partir de graficar la relación entre las intensidades a cada línea de emisión elegida para la (M+S) en eje X, con respecto a los valores de intensidades a cada línea de emisión para la (M+B) en el eje Y. En la Fig. 2.4 se muestra un ejemplo de la calibración realizada por este método.

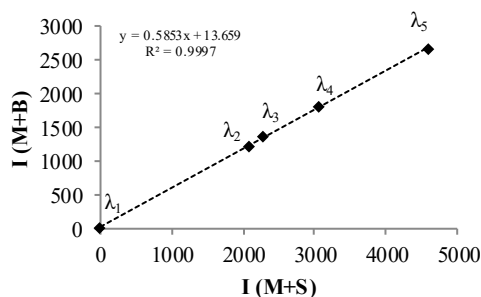


Fig. 2. 4: Proceso de la calibración en el análisis MEC graficando los valores de intensidad de cinco longitudes de onda distintas para la solución (M+S) en el eje x, y los valores de intensidad de las mismas cinco longitudes de onda para la solución (M+B) en el eje y, obtenidas mediante MP-AES en una muestra de vino.

En otras palabras, en el método MEC, se considera la longitud de onda como una variable mientras que la concentración de analitos en cada lectura permanece fija y conocida. Un importante beneficio del MEC es llevar a cabo las mediciones en presencia de la matriz real de las muestras en todas las lecturas. A continuación, se explica el desglose de las ecuaciones que permiten llegar a una ecuación simple para cuantificar el o los elementos en una muestra con este método.

En una curva de calibración externa la señal para la Solución 1 identificada como M+S (muestra más estándares) se expresa de la siguiente forma:

$$Int_{\lambda_i}^{(M+S)} = m \cdot (C^M + C^S) \rightarrow \rightarrow \rightarrow m = \frac{Int_{\lambda_i}^{M+S}}{C^M + C^S} \text{ Ec. 8}$$

Mientras que la ecuación para la muestra sin adiciones de estándar se describe de la siguiente forma:

$$Int_{\lambda_i}^{(M)} = m \cdot C^M \rightarrow \rightarrow m = \frac{Int_{\lambda_i}^M}{C^M} \text{ Ec. 9}$$

Debido a que la Ec. 8 y la Ec. 9 representan mediciones para un mismo analito en las mismas condiciones de matriz e instrumentales, las pendientes “m” tienen igual valor en ambas ecuaciones, e igualando la Ec. 8 con la Ec. 9, eliminando el término m y acomodando se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{Int_{\lambda_i}^M}{C^M} = \frac{Int_{\lambda_i}^{M+S}}{C^M+C^S} \rightarrow \rightarrow Int_{\lambda_i}^M = \left(\frac{C^M}{C^M+C^S}\right) \cdot Int_{\lambda_i}^{M+S} \text{ Ec. 10}$$

La Ec. 10 posee una estructura típica de una función lineal de la forma $y = m'x + b$, donde:

$$x = Int_{\lambda_i}^{M+S} \quad y = Int_{\lambda_i}^M \quad m = \frac{C^M}{C^M+C^S}$$

Despejando C^M de la pendiente se obtiene la Ec. 11:

$$C^M = \left(\frac{m' \cdot C^S}{1-m'}\right) \text{ Ec. 11}$$

Con esta ecuación, y obteniendo el valor de la pendiente m' al haber realizado la curva utilizando el modelo de la Ec. 10, es posible despejar el valor de m' en la Ec. 11 y así determinar la concentración del analito en la muestra.

Tanto SDA como MEC representan una gran novedad en el sentido de que sólo dos soluciones son necesarias para aplicarlos, esto representaría una gran ventaja en cuanto a utilizar menos cantidad de reactivos y muestra, además de facilitar y disminuir los tiempos de análisis típicos para llevar a cabo la realización de cuantificaciones tradicionales como calibración externa (EC), adición de estándar (SA) o calibración con la inclusión de estándar interno (IS), por esta razón se pusieron a punto estas dos metodologías para cuantificar K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Sr, Rb y Al en vinos de tres distintas regiones de México utilizando MP-AES. Por otro lado, una ventaja crucial de ambos métodos es que ninguno de ellos requiere del ajuste de línea base, lo que puede ser un punto crítico para otros métodos de cuantificación, si cada muestra individual presenta otro perfil espectral en la cercanía de la longitud de onda analítica.

4.4.4. Objetivos

Utilizar y adecuar las metodologías dilución de estándar (SDA) y calibración multi-energía (MEC) para el análisis multielemental en vinos mexicanos mediante MP-AES y explorar la identificación geográfica con base en el perfil elemental de los vinos.

4.4.4.1. Objetivos específicos

- Evaluar las metodologías SDA y MEC en muestras de vinos.
- Ajustar las condiciones adecuadas de dilución de vino y parámetros instrumentales para realizar el análisis multielemental con las metodologías mediante MP-AES.
- Realizar un modelo de análisis de componentes principales en muestras de vinos con base en su perfil elemental para determinar el origen geográfico de las muestras.

4.4.5. Materiales y métodos

4.4.5.1. Equipos analíticos

Se utilizó el equipo MP-AES 4100 de Agilent Technologies controlado por el programa MP-expert (actualizado del MP-AES 4200). Se utilizó un generador de nitrógeno Agilent 4107 y un módulo de control de gas externo (EGCM). Se utilizó una cámara ciclónica de un solo paso, nebulizador concéntrico de cuarzo, y tubería de PVC. Debido a la presencia de etanol y de compuestos orgánicos en vino, se utilizó el módulo EGCM para introducir un flujo de aire y así facilitar la oxidación de carbono a dióxido de carbono evitando la formación de depósitos en la antorcha.

4.4.5.2. Materiales y reactivos

Para la preparación de todas las soluciones y las muestras, se utilizó agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco) y ácido nítrico para análisis ultra trazas, el cual fue preparado a partir de la dilución del concentrado (69%) trace Select de Fluka Analytical. Los estándares de rubidio, cromo, magnesio, hierro, aluminio, cobre, potasio, calcio fueron adquiridos de Sigma Aldrich, el estándar de sodio fue adquirido de J.T. Baker, mientras que los estándares de estroncio y manganeso fueron preparados a partir de las sales cloruro de estroncio y cloruro de manganeso (Sigma-Aldrich).

Se compraron doce vinos producidos y embotellados en México en el estado de Guanajuato (G1-G4); Aguascalientes, Ags. (A1-A3) y del Valle de Guadalupe, B.C.

4.4.5.3. Calibración externa y adición de estándar

En primera instancia se utilizó calibración externa (EC) para realizar una estimación de las concentraciones de cada elemento en los vinos, así como para delimitar el pretratamiento de las muestras de vinos, es decir, su correspondiente dilución con HNO₃ 2 %. En esta parte se utilizaron soluciones multielementales de estándares y se realizaron calibraciones de seis puntos para Na, Ca, Mg (0.1 – 7.0 mg L⁻¹); K (0.4-28 mg L⁻¹); Mn, Fe, Al, Se, Cu, Cr (0.01-1.0 mg L⁻¹) y Rb (0.01 – 5.0 mg L⁻¹). De esta forma se establecieron las diluciones de análisis para grupos de elementos: 1:100 para K; 1:50 para Na, Ca, Mg; 1:10 para Mn, Fe, Al, Sr, Rb; y 1:4 para Cu y Cr.

Se llevó también a cabo la determinación de los elementos para cada dilución en particular mediante el método de adición de estándar (SA), para lo cual se realizaron tres adiciones de cada estándar en vinos, correspondientes a 50 %, 100 % y 200 % de la concentración del elemento en la muestra estimada mediante EC. Para esto las alícuotas adecuadas fueron agregadas a vinos diluidos utilizando una dilución adicional 1:1.

4.4.5.4. Cuantificación en vinos mediante la técnica de dilución de estándar (SDA) y dilución de estándar modificado (SDAM)

Los elementos cuantificados por SDA en vinos mediante MP-AES, fueron Mn, Fe, Al, Sr, Rb, Cu y Cr. Para el análisis de los primeros cinco elementos, se analizaron los vinos diluidos 1:10 en ácido nítrico, y para el caso de Cu y Cr se analizaron los vinos utilizando una dilución 1:4. Se prepararon dos soluciones para cada muestra, en la primera solución (SB) se utilizó HNO₃ 1 %, en la solución S1 se utilizaron 2.5 mL del vino a su respectiva dilución y se mezclaron con un volumen igual de blanco (HNO₃ 2 %) además de realizar una adición de estándar de los analitos a cuantificar a una concentración de 6 mg L⁻¹ de Mn, 2.5 mg L⁻¹ de Fe, 5 mg L⁻¹ de Sr, 10 mg L⁻¹ Rb, 1 mg L⁻¹ de Al, 0.5

mg L⁻¹ de Cu, 0.1 mg L⁻¹ de Cr, y 5 mg L⁻¹ de Y como estándar interno, y la última solución (S2) se preparó de la misma forma, pero sin la adición de estándares ni de IS. El análisis inicia con la aspiración de la SB, seguido del reemplazo de esta por la S1; una vez que las señales se estabilizan, se vierte el contenido de la S2 en el recipiente que contiene la S1 sin interrumpir la lectura, observándose una disminución gradual de las intensidades debido a la dilución. La adquisición continua se llevó en tiempo real con 1 s de integración y una réplica única tanto para cada uno de los analitos, como para el IS. Las intensidades correspondientes a la región de dilución (ejemplo Fig. 2.2 región c) fueron utilizadas para llevar a cabo los cálculos de las concentraciones de los analitos.

Se propusieron modificaciones al método original, referido como análisis de dilución de estándar modificado (SDAM), en el cual se prepararon dos soluciones tal y como se describe para SDA, sin embargo, la adición estándar de los elementos correspondió al 50 % de la concentración de los analitos estimada en vinos por los métodos EC y la concentración de IS utilizada fue 25 mg L⁻¹. Se colocaron porciones de 5 mL de la S1 en cinco tubos y posteriormente diferentes volúmenes de alícuotas de la S2 (0, 1, 2, 3, 4, 5 mL) se agregaron a cada uno de los tubos que contenían 5 mL de la S1, se registraron los espectros de emisión aplicando 20 s de tiempo de estabilización, 5 s de integración de la señal con 3 réplicas.

Posterior a la sustracción del blanco, se obtuvieron las funciones de regresión, construidas como se menciona en la sección 3.4.2, y calculando las concentraciones de los analitos en las muestras resolviendo la Ec. 1 ($C_A^M = \frac{m \cdot C_A^{est}}{b \cdot C_{IS}^{est}}$), donde C_A^{est} y C_{IS}^{est} son las concentraciones de analito y IS agregados en la S1, respectivamente, y m y b son la pendiente y el intercepto obtenidos al construir la curva utilizando el modelo de la Ec. 6.

4.4.5.5. Cuantificación en vinos mediante el método de calibración por multi-energía (MEC)

Los elementos cuantificados por el método MEC mediante MP-AES fueron K, Na, Mg y Ca, utilizando factores de dilución para las muestras de vino de 1:100 para el caso del K, y de 1:50 para el resto. Las longitudes de onda analíticas utilizadas para cada elemento se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2. 4: Longitudes de onda utilizadas para llevar a cabo la cuantificación por MEC mediante MP-AES en muestras de vinos.

Elemento	λ_1	λ_2	λ_3	λ_4	λ_5	λ_6
K	693.877 nm	404.721 nm	344.738 nm	404.414 nm	766.491 nm	769.897 nm
Na	568.263 nm	568.820 nm	615.423 nm	330.237 nm	588.995 nm	589.592 nm
Mg	279.553 nm	280.271 nm	517.268 nm	285.213 nm	383.829 nm	518.360 nm
Ca	643.907 nm	445.478 nm	616.217 nm	430.253 nm	393.366 nm	396.847 nm

Para cada elemento fueron preparadas dos soluciones, la primera (M+B) se preparó a partir de la muestra de vino mezclada 1:1 con HNO₃ 2 %, y la segunda (M+S) consistió en la misma muestra (vino diluido 1:1 con HNO₃ 2 %) con una adición estándar multielemental de los analitos a cuantificar, a una concentración correspondiente a la estimación realizada para cada muestra mediante EC. Para

cada longitud de onda, se adquirieron los espectros de (M+B) y (M+S) sin corrección de fondo utilizando los parámetros mostrados en la Tabla 2.5

Tabla 2. 5: Parámetros instrumentales utilizados en MP-AES para las metodologías MEC y SDAM.

Parámetro	Valor
Inyección de aire del módulo ECG	Alta
Presión de nebulización	240 kPa
Velocidad de bomba	6 rpm
Presión de nitrógeno	140 psi
Posición de vista del plasma	-10
Tiempo de estabilización	20 s
Tiempo de integración	3 s

Las ecuaciones de regresión lineal se obtuvieron relacionando las intensidades de las señales analíticas de cada una de las dos soluciones analizadas obtenidas a las longitudes de onda mostradas en la Tabla 2.4. Las concentraciones de los analitos se realizaron utilizando la Ec.11 ($C_A^M = \frac{m' \cdot C_A^{est}}{1-m'}$), en donde C_A^{est} representa la concentración de estándar del analito añadido a la solución (M+S), y la pendiente m' corresponde a la pendiente de la función de regresión lineal mencionada anteriormente.

4.4.5.6. Análisis estadísticos

El resultado de la cuantificación de cada analito en cada muestra fue representado como un promedio con su desviación estándar respectiva (tres réplicas). Se realizó un análisis t de student para las muestras independientes para comparar los promedios de las concentraciones obtenidas por SDAM y MEC contra aquellos obtenidos por SA; para verificar la igualdad de varianzas se llevó a cabo un análisis F-test.

Para mostrar una posible relación entre las concentraciones de los elementos y las regiones geográficas de la procedencia de vinos analizados, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando el programa Unscrambler 7.5 (Camo, Noruega). Se estableció un nivel de significancia $p < 0.05$.

4.4.6. Resultados y discusión

4.4.6.1. Evaluación comparativa de los distintos métodos utilizados

Para el método SDA, la S1 fue preparada con adiciones de estándar que correspondieron al 200 % de la concentración estimada mediante EC para cada muestra, además de agregar 1 mg L^{-1} de Y como IS. Se requirieron concentraciones relativamente altas para una disminución de señales en el área de dilución de la gráfica SDA, sin embargo, en algunas curvas de calibración ($1/[IS]$ vs $\text{Int}_A/\text{Int}_{IS}$) se obtuvieron valores negativos de la pendiente, por lo que se realizó un análisis de las ecuaciones que

describen el método SDA y se llegó a la conclusión que para obtener valores de pendiente positivas se debía cumplir la siguiente condición:

$$\frac{Int_{Ai}}{Int_{Af}} < \frac{Int_{ISi}}{Int_{ISf}}$$

Donde Int_{Ai} e Int_{ISi} representan la intensidad de la señal del analito y del IS, respectivamente, en el punto antes de que inicie el vertido de la S2 en la S1 (inicio de la dilución), mientras que Int_{Af} e Int_{ISf} representan las intensidades de las señales del analito y del IS, respectivamente, al final del proceso de dilución del vertido de S2 en S1.

Debido a esto, la concentración de Y como IS se aumentó a 5 mg L^{-1} , que fue adecuada para elementos traza, pero no para mayoritarios. Para evitar una excesiva dilución de las muestras y elevadas concentraciones de IS, el método SDA fue utilizado únicamente para elementos traza. Como ejemplo se presenta la gráfica obtenida durante la adquisición en tiempo real para Mn (Fig. 2.5 a); se puede observar que una vez que la dilución de S1 con S2 inicia, ocurre una disminución gradual de las señales del analito y del IS hasta que alcanza valores estables correspondientes al final de la dilución. Se tomaron los valores de la relación de la intensidad de la señal del analito entre la del IS y se llevó a cabo la obtención de la ecuación de regresión lineal (Fig. 2.5 b); tanto para este ejemplo ($R^2=0.9737$) como para otros analitos se obtuvieron valores considerablemente menores a 1 en cuanto al factor de regresión.

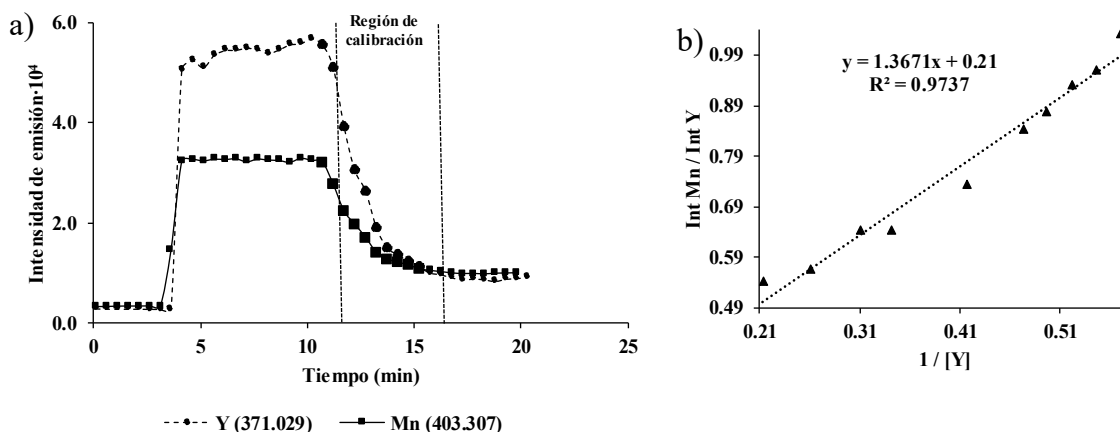


Fig. 2. 5: Aplicación de SDA para el caso de Mn en vinos. a) SDA: gráfica de adquisición en tiempo real para Mn e Y como IS. b) SDA: regresión lineal de la curva de calibración, graficando la relación de las intensidades de la señal del analito entre la del IS (Int_{Mn} / Int_{Y}) con respecto a los recíprocos de la concentración del IS ($1/[Y]$) en cada punto de la región de dilución.

Es importante mencionar que la concentración del IS en cada punto de dilución se calculó asumiendo una disminución lineal de su concentración en S1, lo cual podría no ser una estimación precisa, necesitando de cálculos complejos de resolución de ecuaciones diferenciales y desarrollar un proceso para describir la ecuación diferencial que represente el proceso de dilución en cada caso particular así como determinar con exactitud la concentración al final de la dilución del IS, esto implicaría realizar mecanismos de agitación homogénea, y controlar los flujos de vertido y de ingreso en la cámara de nebulización de las soluciones, lo cual sería poco práctico; otra desventaja considerable de SDA es el corto tiempo de integración, limitando la resolución de la adquisición de las señales en tiempo real.

Debido a que los resultados de SDA no fueron consistentes con los obtenidos mediante SA, y a que presentaron una baja reproducibilidad, se propusieron modificaciones que permitieron resolver las desventajas mencionadas. Como se describe en la sección 3.4.4.4, el método modificado de SDA (SDAM) parte de la preparación de dos soluciones, pero en lugar de verter la S2 en la S1, se tomaron alícuotas de 1 a 5 mL de la S2, se agregaron a porciones de 5 mL de S1 en tubos separados, y las señales de las líneas de emisión de cada elemento fueron adquiridas para cada tubo por separado, utilizando un tiempo de integración de 5 s. Con esto se logró conocer las concentraciones exactas de IS en cada tubo en vez de asumir la dilución en tiempo real, además de disminuir el ruido aplicando mayor tiempo de integración de las señales (5s respecto al máximo de 1 s permitido en el método original). En la Fig. 2.6 se muestran los espectros adquiridos para el Mn y el Y en el análisis de una muestra de vino, además de la curva de calibración obtenida de la misma forma que para SDA. La modificación propuesta muestra una clara mejora en la linealidad ($R^2=0.9977$) además de una mejor precisión.

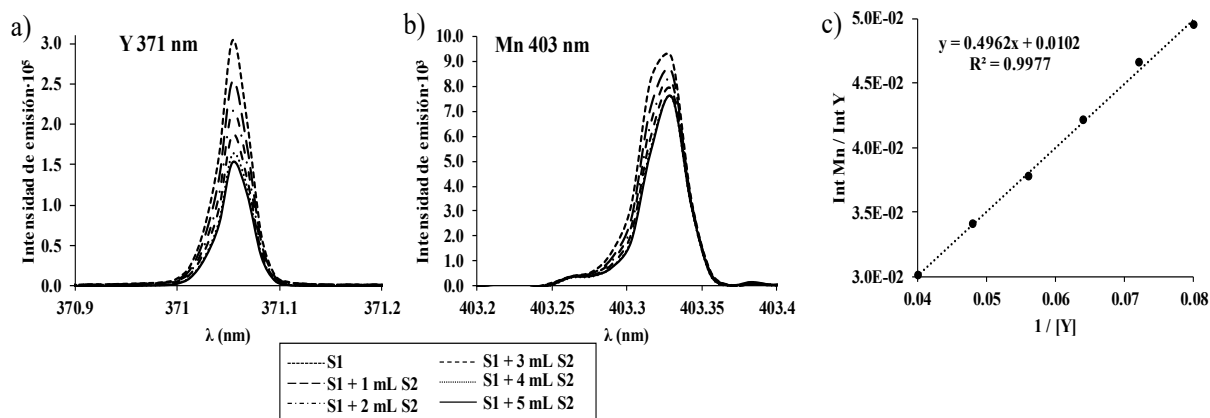


Fig. 2. 6: Aplicación de SDAM a) Espectros adquiridos para Mn b) Espectros adquiridos para Y como IS c) Curva de calibración obtenida para SDAM

El método SDAM es tan eficiente como SA, además de ser más sencillo, incorpora el uso de IS que compensa errores aleatorios, y más importante, posterior a la sustracción del blanco, no se necesita de corrección de fondo.

El otro método analizado fue MEC. Este método también es realizado directamente en la matriz, y no requiere de corrección de fondo. Para realizarlo, como se describe en la sección 3.4.4.5, se preparan dos soluciones y se adquieren los espectros de cada analito para ambas soluciones, midiendo las señales de las líneas de emisión a distintas longitudes de onda de cada analito. El principal requisito que se debe cumplir para la aplicación exitosa de MEC es la disponibilidad de al menos 3 líneas de emisión libres de interferencias para cada elemento, cuyas sensibilidades sean lo suficientemente distintas y permitan la correcta adquisición de señales de las muestras. El último requisito es bastante exigente y puede ser fácilmente cumplido para elementos a altas concentraciones, esto funciona para K, Na, Mg y Ca, los cuales fueron cuantificados mediante MEC al medir la señal de seis longitudes de onda para cada uno de ellos (longitudes mostradas anteriormente en la Tabla 2.4). Como se mencionó en la Sección 3.4.4.5, la concentración de los analitos en las muestras fue calculada con base en las concentraciones de estándar adicionado y la pendiente de calibración de la función que relaciona las intensidades de las señales las longitudes de onda medidas en dos soluciones (la primera

con adición de estándares, y la segunda sin realizar ninguna adición). Como ejemplo, en la Fig. 2.7 a se muestra el gráfico obtenido para el caso de Mg en vino, y los espectros obtenidos para las dos soluciones (M+B) y (M+S) se muestra en la Fig. 2.7 b.

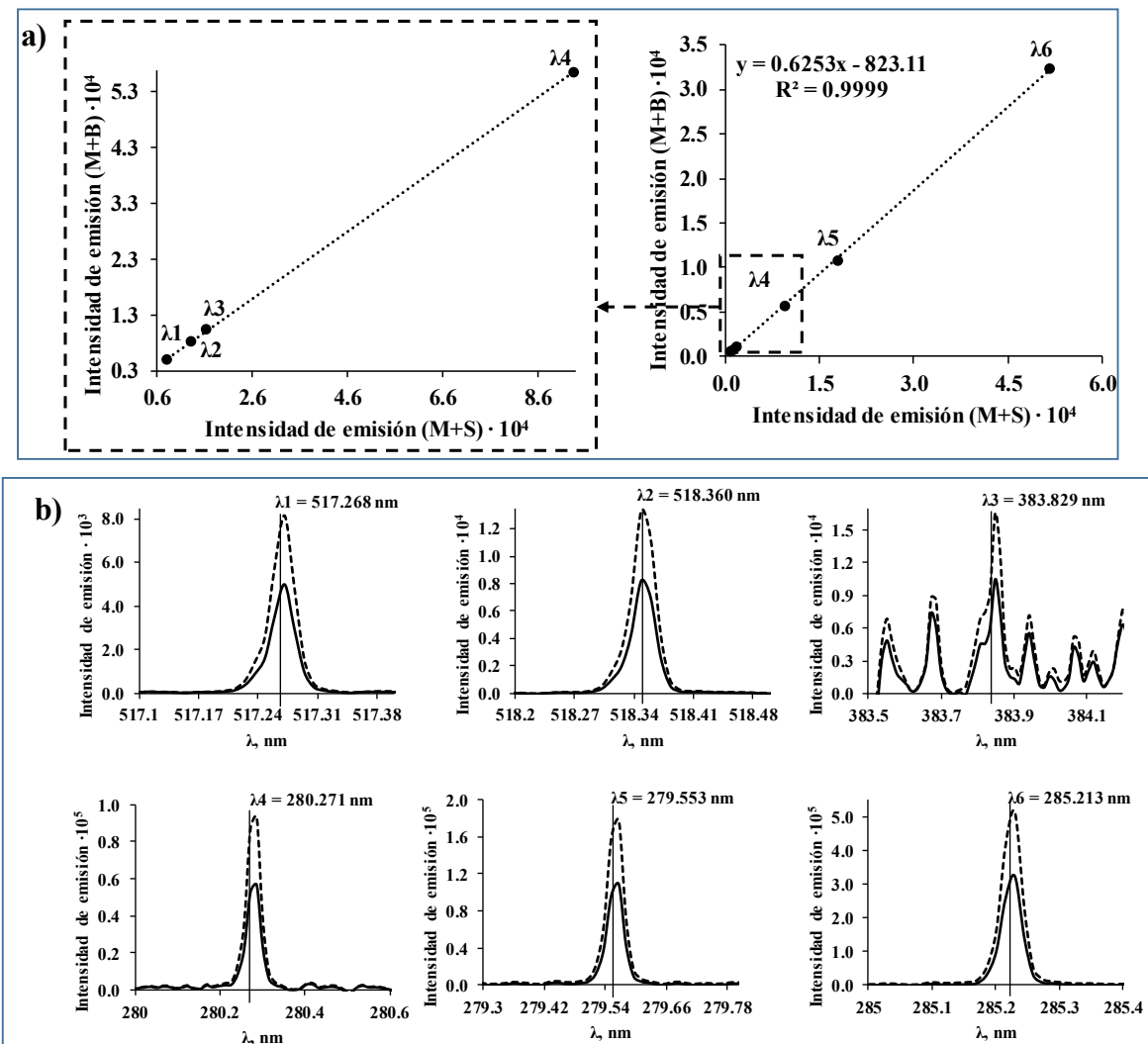


Fig. 2. 7: Aplicación de MEC para la determinación de Mg en vinos. M+B: muestra con blanco; M+S: muestra con adiciones de estándar. a) Gráfica de calibración obtenida para seis longitudes de onda analíticas (derecha) y en el lado izquierdo se presenta una ampliación donde se muestran cuatro longitudes de onda de baja intensidad. b) Espectros de M+B (—) y M+S (---) adquiridos a cada una de las longitudes de onda.

Cabe destacar que se obtuvieron valores de pendiente muy similares cuando se utilizaron todas las longitudes de onda, así como cuando se realiza la calibración utilizando sólo 4 de las longitudes de onda de menor sensibilidad; en ambos casos se obtienen excelentes linealidades con $R^2=0.9999$ (Fig. 2.7 a). Los buenos factores de linealidad de la curva de calibración en MEC reafirman la carencia de interferencias espectrales en todas las longitudes de onda aplicadas.

Se obtuvieron buenas concordancias en la comparación de resultados entre SDAM y SA para la determinación de elementos traza, y también en la comparación de resultados entre MEC y SA para la determinación de elementos mayoritarios a $p < 0.05$, lo cual es indicativo de buenas exactitudes.

Tabla 2. 6: Comparación de los tres métodos de cuantificación utilizados en este trabajo para la determinación de elementos directamente en vinos diluidos. (SA-adición de estándar, SDAM-análisis de dilución de estándar modificado, MEC-calibración multienergía). Los números romanos I, II y III son utilizados para indicar orden decreciente.

Parámetros	SA	SDAM	MEC
Aplicabilidad	Todos los elementos	Elementos minoritarios	Elementos mayoritarios
Pretratamiento de la muestra		Dilución con ácido nítrico 2 %	
Número de soluciones por dilución	4	2	2
Composición de las soluciones	VD+B; VD+50%STD; VD+100%STD ; VD+200%ST	S1:VD+[150%STD+IS] (1:1) S2: VD+B (1:1)	M+B:VD+B (1:1) M+S: VD+100%STD (1:1)
Adquisición de señales	Directamente para cada solución	Directamente para S1, para cinco soluciones obtenidas al mezclar S1 (5mL) con diferentes alícuotas de S2 (1-5 mL)	Directamente para cada solución
Número de longitudes de onda por analito	1	1	6
Corrección de fondo	Manual	No se requiere	No se requiere
Consumo de muestra y HNO ₃	I	II	III
Simplicidad de las operaciones manuales	III	II	I
Simplicidad de la adquisición de señales	I	I	II
Simplicidad de cálculos	II	II	I
Tiempo total del análisis	II	I	III

VD-vino diluido: 1:100 para K, 1:50 para Na, Mg, Ca, 1:10 para Sr, Rb, Mn, Fe, Al, 1:4 para Cu, Cr; B-blanco: HNO₃ 2 % v/v; STD-mezcla de soluciones estándar de los analitos; los valores de porcentaje indican la concentración de estándar agregado con respecto a la estimación en muestras mediante EC; IS-estándar interno

En este trabajo se exploraron tres métodos de cuantificación los cuales demostraron ser adecuados para la cuantificación de elementos en muestras de vino diluidas. La evaluación de la comparación de estos tres métodos se muestra en la Tabla 2.6. Mientras que SA permite la cuantificación de todos los analitos, SDAM fue adecuada para los siete elementos minoritarios y MEC para los cuatro elementos mayoritarios. No obstante, en la aplicación de SDAM puede ser extendida aumentando la dilución de la muestra para incluir K, Na, Ca y Mg, aunque mayores factores de dilución podrían afectar la precisión en la medición de elementos minoritarios. Para el caso de MEC, las líneas espectrales fueron elegidas de entre aquellas enlistadas por defecto por el fabricante en el software

MP-expert, sin embargo, al utilizar bibliotecas espectrales (como por ejemplo NIST), la cantidad de longitudes de onda para cada elemento podría aumentar facilitando la cuantificación de elementos minoritarios. Debido a la corrección de línea base, SA es el método más demandante de entre los tres, debido a que se debe realizar una corrección manual para cada una de las muestras de vino y para cada dilución; una ventaja destacable de SDAM y MEC es que no se requiere de un proceso de corrección de fondo. La simplicidad en términos de operación manual, adquisición de señales y el proceso de cálculos es resumido en la Tabla 2.6.

Con respecto al tiempo total de análisis el que menos consume es SDAM seguido de SA y MEC; en este último se requiere un tiempo de análisis mayor debido a que se requiere la adquisición de un gran número de líneas de emisión (en este trabajo 6) para cada elemento. Por último, la ventaja específica de SDAM es el uso de IS. Con base en la evaluación anterior y a los resultados obtenidos, SDAM es recomendable para la determinación de elementos minoritarios en vinos, mientras que MEC es más eficaz para la medición de elementos mayoritarios.

4.4.6.2. Concentraciones de metales mayoritarios y traza en vinos mexicanos como potenciales indicadores de su procedencia

Utilizando los procedimientos establecidos, se llevó a cabo la determinación de once elementos en doce vinos mexicanos (detalles en la tesis de maestría de Espinoza-Cruz [129]). Cabe mencionar que tanto para los elementos traza determinados por SDAM como para los mayoritarios determinados por MEC, se obtuvo muy buena concordancia con los resultados obtenidos para las mismas muestras mediante el método de SA.

Los intervalos de concentración obtenidos de cada elemento para vinos mexicanos fueron los siguientes: 866–4896 mg L⁻¹ K, 32.7–326 mg L⁻¹ Na, 56.6–164 mg L⁻¹ Mg, 63.9–121 mg L⁻¹ Ca, 0.56–1.90 mg L⁻¹ Sr, 0.35–6.31 mg L⁻¹ Rb, 0.21–2.11 mg L⁻¹ Fe, 0.69–1.72 mg L⁻¹ Mn, 0.28–0.78 mg L⁻¹ Al, 0.10–0.42 mg L⁻¹ Cu; y el Cr no fue detectado en ninguna muestra de vino. De acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas que regulan Na, K y CaO en bebidas alcohólicas con límites máximos permisibles de 230 mg L⁻¹, 1 700 mg L⁻¹ y 300 mg L⁻¹, respectivamente, sólo un vino del Valle de Guadalupe sobrepasó el límite para Na (326 ± 18 mg L⁻¹), mientras que todas las muestras de Guanajuato y dos del Valle de Guadalupe excedieron el límite permisible de K. Algunos elementos determinados en este trabajo son regulados en Croacia (10 mg L⁻¹ Al, 0.1 mg L⁻¹ Cr, 1.0 mg L⁻¹ Cu, 20 mg L⁻¹ Fe, 20 mg L⁻¹ Na), de acuerdo a la cual todos los vinos mexicanos superan los límites máximos permisibles para Na. Los vinos analizados cumplen con las regulaciones alemanas de Al a 8 mg L⁻¹ y Cu a 5 mg L⁻¹, además de poseer concentraciones menores de Cu a las establecidas por la OIV (Organización Internacional de la Viña y el vino) y en Italia (1 mg L⁻¹ y 5 mg L⁻¹, respectivamente).

En la Fig. 2.8 se representan los promedios de las concentraciones de elementos con sus respectivas desviaciones estándar para cada región vinícola. Las diferencias entre regiones pueden ser observadas fácilmente en el gráfico prácticamente para todos los elementos, con distintivos altos niveles de Rb y de K en vinos producidos en Guanajuato, y concentraciones significativamente elevadas de Mn y Na en vinos producidos en Valle de Guadalupe, en comparación con las otras regiones. Para establecer una posible relación entre las concentraciones de los elementos con las regiones geográficas de

producción de los vinos se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA). Los datos obtenidos para todos los elementos analizados en los doce vinos mexicanos fueron utilizados para la construcción del modelo PCA, en el cual los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2) presentaron el 74 % de la variabilidad total.

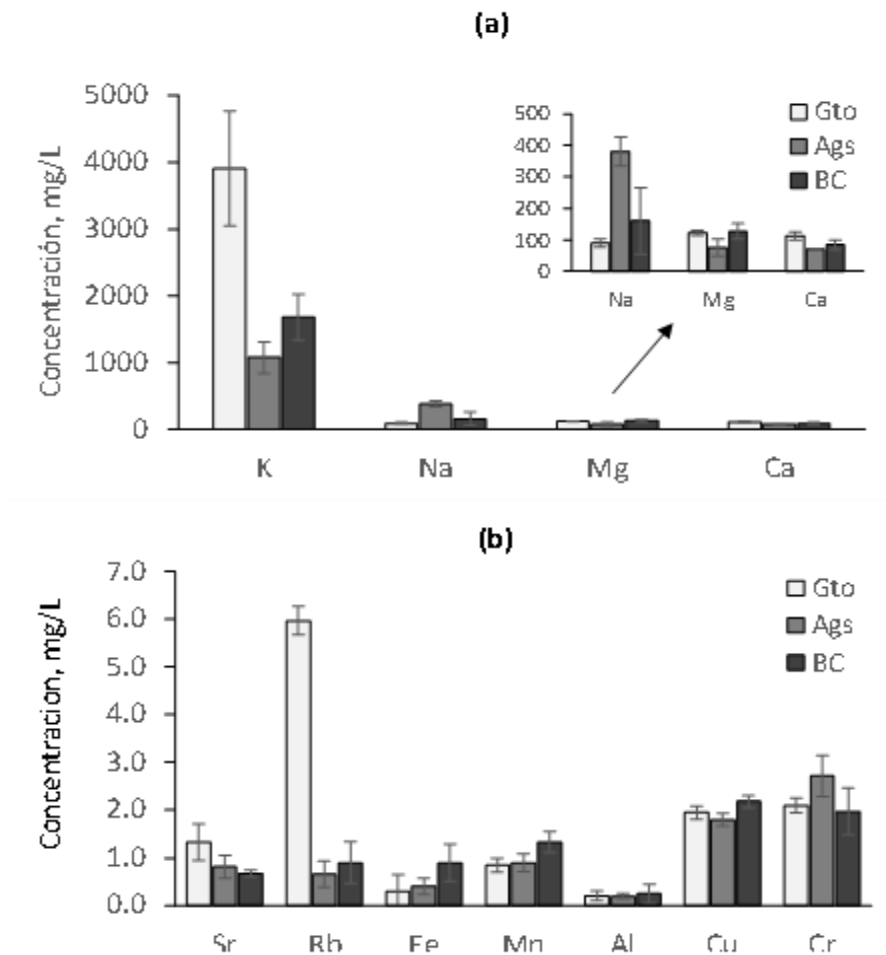


Fig. 2. 8: Concentraciones de los elementos analizados en vinos mexicanos, cada barra representa el promedio con la respectiva desviación estándar, con base en resultados individuales obtenidos para todas las muestras de las regiones vinícolas: Gto-Guanajuato, Ags-Aguascalientes, BC-Valle de Guadalupe, B.C. a) Elementos mayoritarios. b) Elementos minoritarios.

Los gráficos de puntuaciones (“scores”), producto del modelo obtenido del PCA, representan visualmente las combinaciones lineales de los datos que se determinan por los componentes principales, y sirven para explicar la mayor parte de la varianza en los datos, de tal manera que se puede evaluar la estructura de los datos y detectar agrupaciones y tendencias para indicar posibles interacciones y relaciones entre los grupos de datos analizados. Como se puede notar en la Fig. 2.9 a, el gráfico de puntuaciones agrupa las muestras de acuerdo a la región vinícola de procedencia.

Además de los gráficos de puntajes, mediante el PCA se puede obtener también el gráfico de influencias (X-loadings) que es la representación de las variables con respecto a la posición que tienen en los primeros dos componentes principales (PC1 vs PC2) y son utilizadas para identificar cuáles

variables tienen el mayor efecto en cada componente. En la Fig. 2.9b se muestra el gráfico de influencias para las variables (metales analizados) para las muestras de vinos, los cuales muestran agrupaciones similares a las mostradas para el gráfico de puntuaciones. Específicamente K, Rb, Sr y Ca son variables asociadas con vinos de Guanajuato, mientras que concentraciones elevadas de Na, Cu y Mn forman una aglomeración en el espacio correspondiente a las muestras de Valle de Guadalupe, B.C. El Mg está asociado con estas dos regiones, Guanajuato y Valle de Guadalupe. No se mostraron agrupaciones evidentes de las variables (elementos analizados) en el espacio correspondiente a la puntuación de las muestras de Aguascalientes, sin embargo, se nota que el Fe, Al y Sr están asociados con los vinos de esta región.

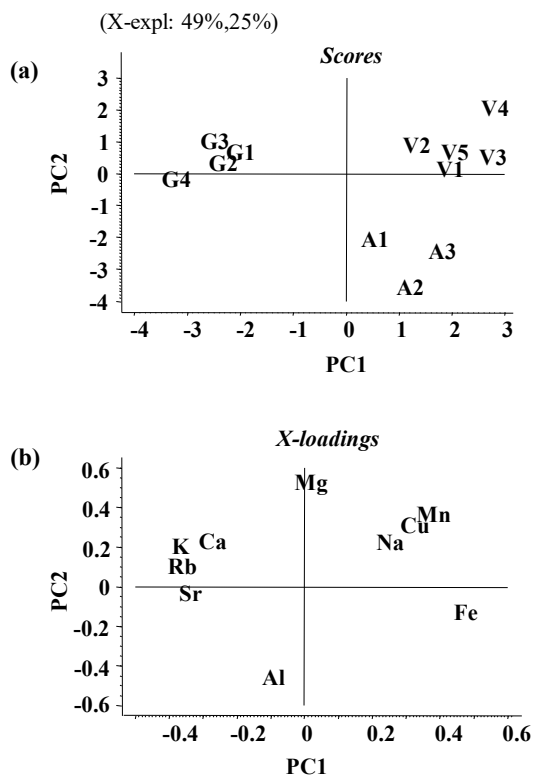


Fig. 2. 9: Modelo bidimensional obtenido por análisis de componentes principales para las concentraciones de diez elementos en doce muestras de vinos mexicanos; los primeros componentes principales (PC1 y PC2) representan el 49 % y 25 % de la variabilidad total de los datos. a) Gráfico de puntuaciones que muestra la distribución de las muestras de acuerdo a su región vinícola: G1-G4-Guanajuato; A1-A3-Aguascalientes; V1-V5-Valle de Guadalupe, B.C. b) Gráfico de influencia que muestra la distribución de los elementos en el mismo espacio bidimensional que el gráfico de puntuaciones.

Hasta donde sabemos, las concentraciones de elementos en vinos mexicanos han sido reportadas únicamente en un estudio previo y se analizaron sólo vinos producidos en el estado de Baja California [125]; las altas cantidades de Na reportadas en este estudio coinciden con la asociación de nuestras observaciones en las que por medio del PCA se relaciona este elemento con los vinos procedentes de la región de Valle de Guadalupe, estado de Baja California. Además, estudios hidro-geoquímicos realizados en el único acuífero de Valle de Guadalupe revelan una contaminación con Cu debida a productos de fertilización, lo cual refuerza la asociación del Cu con vinos de esta región de acuerdo

al modelo PCA obtenido en nuestro estudio. Con respecto a Guanajuato, la cual es una zona minera de oro y plata cuya geología está relacionada con sedimentos volcánicos de cretáceo con abundantes minerales de cuarzo y calcita [130], podría contribuir a las altas concentraciones de K, Rb, Sr, y Ca encontradas en vinos.

Aunque en este estudio se reporta el análisis realizado para doce vinos, los resultados del PCA indican que el perfil de metales susceptibles a determinar en MP-AES, son bastante adecuados para realizar una discriminación de vinos de acuerdo a su región de producción. Como puede verse en la Fig. 2.9, no existe una clara asociación para ninguno de los vinos de Aguascalientes; no obstante, estos vinos se encuentran claramente separados de aquellos de Guanajuato, a pesar de ser áreas geográficamente vecinas.

4.4.7. Conclusiones

En este trabajo se utilizó MP-AES para la determinación de elementos mayoritarios y traza en vinos mexicanos, con el objetivo de lograr dos metas: (i) lograr la cuantificación confiable en condiciones adecuadas de análisis de largas series de muestras (tratamiento de muestra simple, sin necesidad de corrección de línea base para cada muestra), (ii) explorar la capacidad del MP-AES en el análisis de separación de vinos producidos en regiones geográficamente distintas.

En cuanto al tratamiento de muestra, se utilizó una dilución de vino con HNO_3 2 % y se establecieron los factores de dilución para cuatro grupos de elementos. En tales muestras, se evaluaron distintos métodos de cuantificación en presencia de matriz y fueron comparativamente evaluados; con base a los resultados obtenidos se propuso una modificación al método de SDA que resultó atractivo para la determinación de elementos traza mientras que para el caso de elementos mayoritarios se demostró la utilidad del método MEC. Los dos métodos proporcionaron resultados en concordancia con los obtenidos con el método clásico de adición de estándar (SA). Las ventajas de SDAM y MEC consisten en una simplicidad de las operaciones y no se requirió de la corrección de fondo. El uso de Y como IS es también otro punto fuerte del uso de SDAM.

En la segunda parte, mediante el análisis de componentes principales, se demostró la utilidad de niveles de los elementos seleccionados en vinos mexicanos para separar dichos vinos de acuerdo a la región de producción. Específicamente se observó la agrupación de vinos fabricados en Guanajuato con Rb, K, Ca y Sr, mientras que Na, Cu y Mn fueron asociados con los vinos procedentes del Valle de Guadalupe. Los vinos de Aguascalientes presentaron concentraciones relativamente altas de Fe y Al, aunque no hubo un agrupamiento evidente de las variables. Los resultados de PCA son prometedores, y podría establecerse un modelo de discriminación geográfica para abarcar una mayor cantidad de muestras en el estudio.

5. Capítulo 5: Revisión bibliográfica sobre los enfoques analíticos de metabolómica de Se en plantas superiores

Este capítulo fue realizado como prefacio de la parte del proyecto con enfoque metabolómico y foodómico, cuyo objetivo fue estudiar el impacto de Se en raíces de cebolla a nivel metabolómico. Dicha experimentación se vio interrumpida en más de una ocasión por causas ajenas a nuestro grupo de investigación, no obstante, se tomó parte de este tiempo para realizar una revisión bibliográfica de trabajos recientes de gran relevancia en la investigación del metabolismo del selenio. En este sentido, se presenta una revisión acerca de los sistemas de estudio, así como las respectivas herramientas analíticas disponibles para llevar a cabo cada una de las estrategias más útiles en el estudio del metabolismo del Se en plantas, así como la respuesta bifásica que tiene la exposición en distintas plantas. Se discuten la forma en la que el Se afecta el metabolismo primario y secundario de las plantas, y además se centra en los enfoques metabolómicos dirigidos, semi-dirigidos y no dirigidos como estrategias de estudio relevantes para la actual posición de la investigación con respecto a la seleno-metabolómica (Se-metabolómica)

5.1. Selenio en plantas: aspectos generales y marco teórico

Durante varias décadas se han estudiado los efectos y funciones del selenio (Se) en los organismos vivos, de hecho, el Se es uno de los elementos químicos más intrigantes en diferentes contextos y aplicaciones. El Se no se encuentra distribuido de manera uniforme en la superficie de la tierra, y algunas zonas que contienen suelos seleníferos (con niveles de Se de $2 - 1\ 200\ \text{mg kg}^{-1}$) pueden llegar a ubicarse cerca de suelos con bajos niveles de Se, como ocurre en algunas zonas de China, donde por ejemplo, la Provincia Enshi que se caracteriza por presentar suelos seleníferos, está ubicada muy cerca del área Keshan, la cual se caracteriza por tener suelos con bajos niveles de Se [131]. Muchas especies de plantas superiores nativas de suelos seleníferos han desarrollado mecanismos que les confieren la capacidad de sobrevivir en su hábitat natural, a pesar de las altas concentraciones de Se en suelo y, por lo tanto, a los altos niveles que pueden llegar a acumularse en sus tejidos. De acuerdo a lo anterior, las plantas han sido clasificadas como tolerantes con capacidad de acumulación de Se, y como susceptibles al Se carentes de dicha capacidad y que además muestran síntomas de toxicidad incluso a niveles relativamente bajos de Se. Además, las plantas que contienen un rango de concentración de Se entre $1\ 000 - 15\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$ (masa fresca) son conocidas como seleno-hiperacumuladoras, por otro lado, las acumuladoras secundarias son aquellas cuyo nivel de Se no excede los $1\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$ (masa fresca), y, por último, las plantas no-acumuladoras poseen concentraciones de $\text{Se} \leq 100\ \text{mg kg}^{-1}$ (masa fresca). En la Fig. 3.1 se resume la clasificación descrita anteriormente y se muestran algunos ejemplos representativos; es importante mencionar que no existe una relación estricta entre la capacidad de acumular Se con la familia ni con el género al que una planta pertenece. Por ejemplo, dentro de la familia Brassicaceae, se encuentra la especie *Stanleya pinnata*, la cual es una de las plantas hiperacumuladoras más estudiadas, mientras que *Stanleya elata* pertenece al grupo de plantas no-acumuladoras [132].

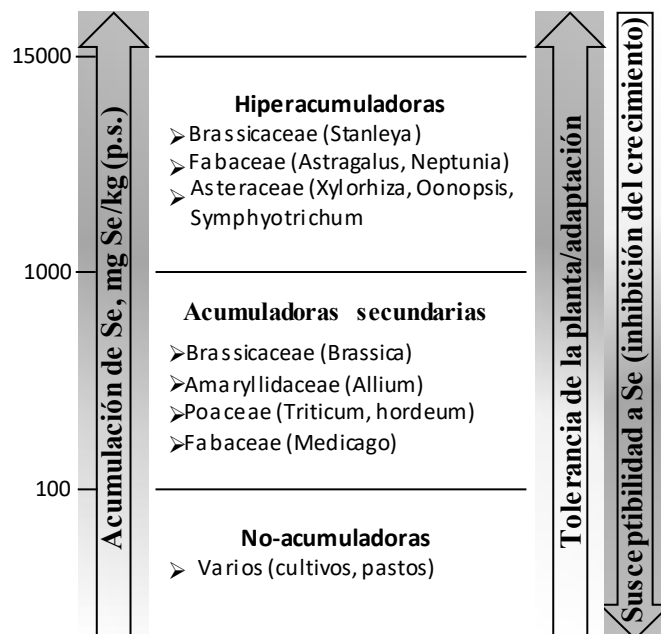


Fig. 3. 1: Clasificación general de las plantas de acuerdo a su capacidad para adaptarse a condiciones en presencia de Se. p.s.: Peso seco.

Los mecanismos de acumulación/volatilización de Se, así como los mecanismos subyacentes de la tolerancia en plantas han sido ampliamente estudiados; algunos de los procesos involucrados, como la síntesis de compuestos orgánicos de Se (oSe) han sido relacionados con un mejor crecimiento, aumento de la capacidad antioxidante y una defensa más eficiente contra diferentes tipos de estrés tanto biótico como abiótico [133-135]. Por otro lado, los compuestos de oSe provenientes del metabolismo de la planta, presentan actividades de gran importancia biológica en la quimio-prevención del cáncer, protección contra enfermedades crónico-degenerativas y además se ha demostrado su importancia en la nutrición humana [136-138]. En este sentido, se han realizado varios estudios con la finalidad de identificar y de cuantificar las especies de Se en plantas expuestas a dicho elemento, enfocándose en la elaboración de alimentos y/o suplementos que contengan oSe biodisponible [139-141]. Es importante mencionar que se requiere que el Se sea liberado en concentraciones y formas adecuadas para lograr una mejor producción agrícola y lograr producir cultivos con valores nutricionales mejorados, esto debido al aumento de aminoácidos libres, proteínas y distintos tipos de fitoquímicos que promuevan la salud [142-144]. No obstante, existen evidencias experimentales relacionadas con los efectos tóxicos que puede provocar el exceso de Se, sobre todo en plantas no-acumuladoras, siendo un tema que amerita especial atención [143, 145, 146]. La suministración del Se a concentraciones alrededor de 20 μM o mayores producen efectos negativos en el crecimiento de plantas no-acumuladoras, algunos de los cuales incluyen clorosis, estados alterados de micro y macronutrientes y afecta la estructura y funcionalidad de proteínas debido a incorporaciones no-específicas de Se en forma de Se-análogos de metionina (Met) y cisteína (Cys), es decir selenometionina (SeMet) y selenocisteína (SeCys) [147, 148].

De acuerdo a lo anterior, es posible distinguir los siguientes sistemas en el estudio de Se en plantas superiores: (i) captación y biotransformación de Se, (ii) impacto de Se en el metabolismo de plantas,

(iii) aplicación de plantas en la fitorremediación de sitios contaminados por Se, (iv) efectos benéficos a la salud de metabolitos de Se, (v) bio-fortificación con Se en plantas comestibles para propósitos nutricionales, (vi) aplicación de herramientas biotecnológicas para producir alimentos funcionales bio-fortificados con Se.

Se han llevado a cabo varios estudios de los sistemas anteriores utilizando en distintos trabajos una amplia variedad de tipos de plantas, así como de distintas condiciones experimentales; en este sentido es importante mencionar que las herramientas para aplicaciones “ómicas” han ido adquiriendo un gran interés de forma gradual para la investigación de dichos temas [142, 149, 150].

5.2. Enfoques metabolómicos en estudios de selenio en plantas

Como parte integral de la biología de sistemas, la metabolómica proporciona datos de compuestos con bajas masas moleculares que son productos del metabolismo; este componente “ómico” es de gran interés debido a la alteración o formación de diferentes metabolitos que pudieran surgir debido a la exposición a Se, además de la importancia biológica y en la salud que pudieran mostrar.

En la Fig. 3.2 se resumen los principales enfoques del análisis metabolómico en plantas expuestas a Se. Se han estudiado distintas especies de plantas acumuladoras y no-acumuladoras en diferentes niveles de su etapa de crecimiento, así como en diferentes partes morfológicas [141, 151, 152]. Los estados tempranos de crecimiento incluyen brotes [153-156] y semilleros [150, 157, 158], mientras que en plantas jóvenes o maduras, las partes morfológicas más estudiadas son raíces [159, 160], hojas [159, 161], flores [160, 162], frutos [163, 164], y semillas [165-167].

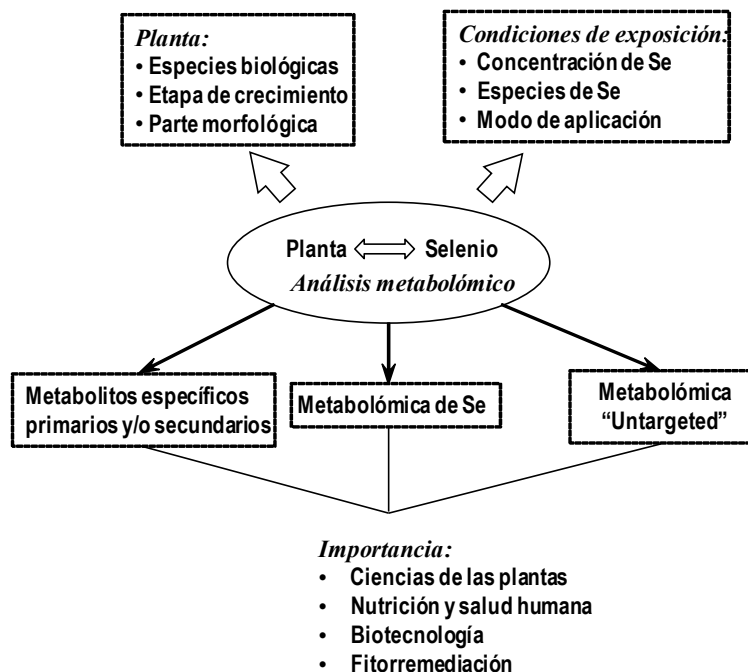


Fig. 3. 2: Aspectos clave en los enfoques metabolómicos realizados en plantas expuestas a selenio.

La concentración de Se, su forma fisicoquímica y el modo de exposición son factores importantes que pueden afectar potencialmente el metaboloma de las plantas [168-170]. La mayoría de estudios se han realizado en cultivos hidropónicos, utilizando medios de crecimiento modificados con sales inorgánicas de Se, o de manera menos común utilizando compuestos oSe [156, 164, 171-173]. En cuanto a las formas de exposición se ha utilizado aplicación foliar tanto de especies orgánicas como inorgánicas de Se [144, 145, 159, 169, 174-176] y en experimentos en campo se ha explorado la fertilización del suelo con distintas formas de Se [170, 177]. De manera reciente, se han realizado algunas implementaciones en la exposición de Se, como lo son: la inoculación de microorganismos en cultivos de plantas expuestas, con la finalidad de lograr una captación de Se mucho más eficiente [160, 178, 179]; el uso de plantas hiperacumuladoras como fuente de oSe para los cultivos [180-182]; y la fertilización con nanopartículas de Se [170].

Una vez que se establece el diseño experimental de acuerdo al enfoque del estudio, se pueden distinguir dos vertientes en la metabolómica de plantas expuestas a Se (Fig. 3.2). La primera de ellas es la caracterización de compuestos de Se, su cuantificación y la elucidación de las rutas de biotransformación. Este tema ha sido ampliamente estudiado a lo largo de décadas pasadas, y los avances han sido discutidos en una serie de artículos de revisión [133, 181, 183-187]. El otro tema de importancia, que también ha sido ampliamente estudiado, comprende la evaluación del impacto del Se en el metabolismo de las plantas (Fig. 3.2), y en este sentido, los estudios se han centrado en indicadores del estrés, actividad antioxidante, actividad de enzimas específicas, y recientemente en la evaluación de metabolitos primarios y secundarios con la ayuda de herramientas metabolómicas [171, 186].

5.3. Esquemas y herramientas en el análisis metabolómico

Para evaluar los cambios que ocurren a nivel del metaboloma, se analizan plantas expuestas y controles no-expuestos utilizando los enfoques metabolómicos dirigidos, semi-dirigidos o de forma menos común, no dirigidos, los cuales se resumen esquemáticamente en la Fig. 3.3. Los enfoques metabolómicos semi-dirigidos y dirigidos han sido utilizados en numerosos estudios, enfocándose principalmente en compuestos de Se productos del estrés, antioxidantes, moléculas involucradas en la traducción de señales, y metabolitos primarios y secundarios. Para llevar a cabo este tipo de estudios, existen una gran variedad de herramientas analíticas que pueden ser utilizadas, las cuales consisten desde simples ensayos espectrofotométricos hasta técnicas sofisticadas híbridas de separación con espectrometría de masas, las cuales permiten una gran capacidad de selectividad y sensibilidad, además de tener la capacidad de elucidación estructural.

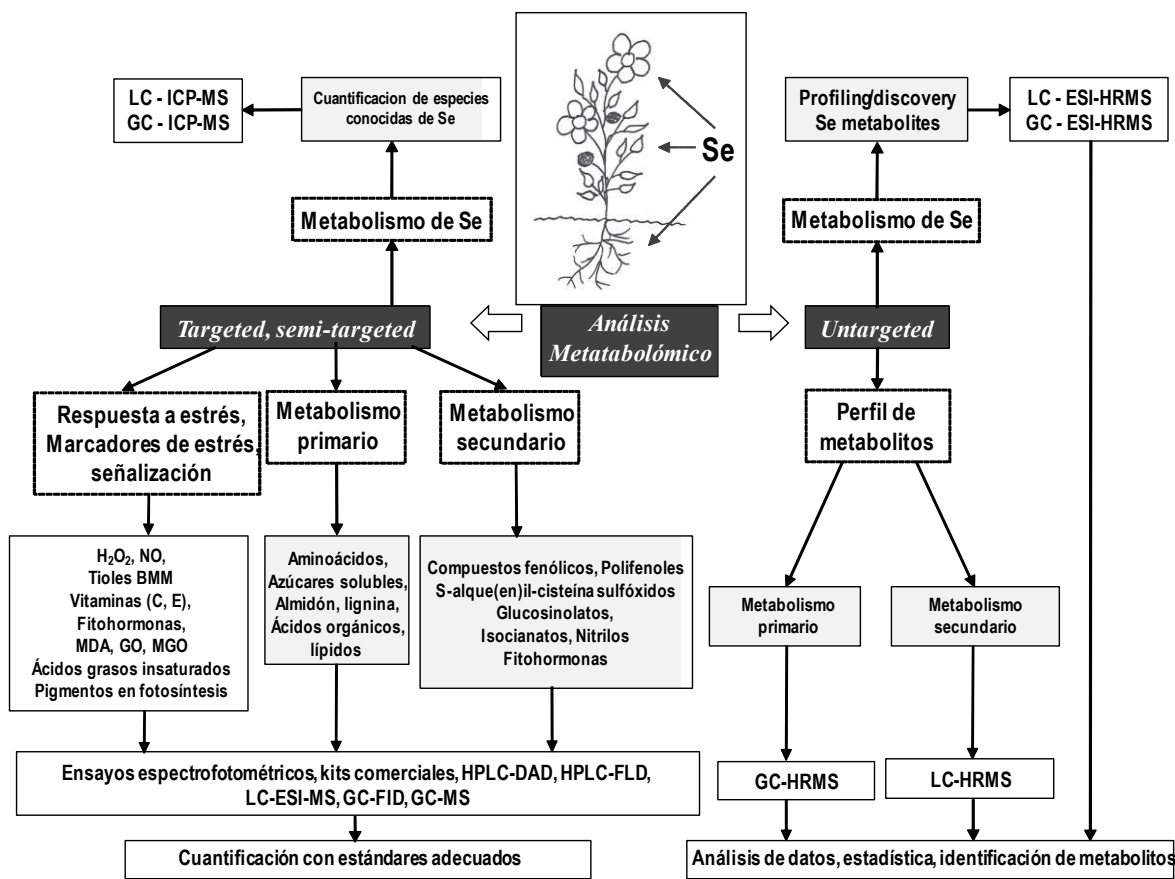


Fig. 3. 3: Enfoques en el análisis de metabolitos de plantas expuestas a Se. (BMM-baja masa molecular, GO-glioxal, MGO-metliglioxaal, HR-alta resolución)

En metabolómica dirigida se analizan metabolitos de identidad conocida o con una función biológica definida, esto permite seleccionar de forma eficiente los procesos de pretratamiento de muestra, así como realizar la cuantificación con base en estándares auténticos. Por otro lado, el enfoque semi-dirigido se enfoca en el análisis de grupos de metabolitos conocidos o esperados, con una menor selectividad en comparación con los análisis dirigidos, además de que no es común realizar la cuantificación de todos los compuestos por la falta de estándares para varios metabolitos. En las secciones 5.4 y 5.5 se presenta una breve revisión de los análisis dirigidos y semi-dirigidos, y en la Tabla 3.1 se incluyen ejemplos específicos de estos enfoques.

El objetivo principal de la metabolómica comparativa no dirigida es obtener, de la forma más completa posible, información sobre los metabolitos afectados por las condiciones de exposición; sin embargo, las diferentes propiedades fisicoquímicas que presentan los metabolitos como polaridad, carga, volatilidad y distintos rangos de sus concentraciones, provocan que la extracción simultánea de todos los compuestos individuales de los tejidos en plantas sea prácticamente imposible. Generalmente, para realizar la extracción de compuestos semi-polares se utilizan metanol o mezclas acidificadas agua-metanol, y los análisis son realizados mediante cromatografía en fase inversa (RP-HPLC) en escala capilar o nano, y espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS). Este enfoque es aplicado principalmente en estudios centrados en el metabolismo secundario [164, 188-190]. Para el análisis de perfiles de metabolitos volátiles en plantas o aquellos que pueden ser transformados en

especies volátiles/semivolátiles y termoestables mediante derivatización química, puede ser utilizada la instrumentación de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Con estas herramientas, se han obtenido los datos de compuestos fitovolátiles y/o metabolitos primarios como aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos y ácidos orgánicos [153, 189]. Mientras que los compuestos volátiles pueden ser captados en la parte aérea “headspace” (HS) de la planta mediante micro-extracción en fase sólida (SPME) e introducirse directamente al instrumento [191], para otros compuestos es necesario llevar a cabo un proceso de extracción, utilizando comúnmente metanol, mezclas cloroformo-metanol y/o agua [153, 188, 192]. Las principales estrategias de derivatización comprenden la silylación [193, 194], o la aplicación de alquil cloroformatos [195].

El análisis de datos obtenidos del enfoque metabolómico no dirigido mediante cromatografía-espectrometría de masas es retador debido a la gran cantidad de datos y su multidimensionalidad; de hecho, la identificación de la totalidad de los compuestos presentes en el extracto analizado no es factible. El flujo de trabajo para el procesamiento de estos datos inicia con la filtración y corrección de ruido, posteriormente se realiza la detección de los picos cromatográficos, su deconvolución, alineación y normalización para generar una lista de las características moleculares [195, 196]. Posteriormente se aplican herramientas para realizar análisis estadísticos con la finalidad de detectar las razones de cambio individuales de cada característica entre las plantas expuestas y no-expuestas, bajo criterios estadísticos establecidos; con esto, la cantidad de compuestos a identificar disminuye drásticamente. Por último se lleva a cabo la identificación de metabolitos de interés, un proceso que es bastante complejo debido a que muchos compuestos (en especial los metabolitos secundarios) presentan valores de masa, estructura y funciones muy similares, de hecho, aun cuando se obtienen precisiones de masa < 1 ppm, es difícil garantizar la identificación definitiva de un compuesto [197]. Para ayudar a encontrar e identificar metabolitos de importancia biológica, así como asignarlos en rutas biológicas, han sido desarrollados y aplicados una gran variedad de métodos computacionales en estudios de metabolómica en plantas [190, 196, 198-201]; en la sección 4.5.5 se discuten brevemente algunos ejemplos de metabolómica no dirigida en plantas expuestas a Se.

5.4. Metabolización del selenio y análisis de metabolitos de selenio en plantas

5.4.1. Rutas de captación, transporte y biotransformación del selenio

La captación de Se en plantas superiores ocurre mediante el transporte activo en las membranas y depende en gran medida de la forma química del Se; las especies orgánicas tienen más disponibilidad para las plantas en comparación con sus formas inorgánicas, y el selenato (Se(VI)) es internalizado de manera más eficiente en comparación con el selenito (Se(IV)). Cuando las plantas son expuestas a selenio inorgánico (iSe), los transportadores de sulfato y fosfato se encuentran involucrados en la captación de Se(VI) y Se(IV), respectivamente, mientras que para la captación de especies de oSe se ha propuesto la participación de transportadores de aminoácidos [133, 186].

Una vez que el Se ha sido internalizado, su transporte y metabolización también son dependientes de la especie; el Se(VI) es transportado de forma rápida mediante el xilema hacia las partes aéreas, y luego es biotransformado o secuestrado en las vacuolas, mientras que Se(IV) es convertido rápidamente a especies orgánicas una vez que se encuentra en la raíz, formando por ejemplo, análogos de Se de metionina y de cisteína que pueden incorporarse de manera no-específica en las proteínas [186, 202]. La información disponible sobre el transporte de especies de oSe es menos abundante, sin embargo se han reportado tanto su conversión como su eficiencia de transporte [184, 187, 203, 204].

Debido a las similitudes fisicoquímicas que presentan el selenio y el azufre, las rutas metabólicas de estos elementos en plantas están estrechamente relacionadas. Específicamente, el Se utiliza las rutas de asimilación de azufre, en las cuales la reducción gradual a seleniuro (Se^{-2}) ocurre con la posterior incorporación de Se en aminoácidos y, en el caso de las plantas acumuladoras, el Se^{-2} se incorpora en especies metiladas de bajo peso molecular [183]. En este esquema general, se encuentran implicadas distintas reacciones químicas y bioquímicas, produciendo la formación de un amplio grupo de compuestos de Se [135, 147, 186].

Una captación excesiva de Se puede provocar efectos adversos, sobre todo en plantas no-acumuladoras; además del aumento en el estrés oxidativo, la incorporación inespecífica de Se-aminoácidos en vez de sus análogos de azufre ha sido asociado con la toxicidad de Se en plantas. Un mecanismo de defensa desarrollado por las plantas acumuladoras e hiperacumuladoras de Se consiste en la síntesis de distintas especies metiladas que no pueden ser incorporadas en la estructura de las proteínas; otro mecanismo importante es la fitovolatilización, en la cual, se liberan especies alquiladas de Se [181, 183].

La defensa eficiente en ambientes con alto contenido de Se es importante en la rama de la agricultura, y de forma más importante, se ha demostrado que algunas especies metiladas de Se (precursores de metilselenol) tienen un gran impacto en la salud humana [137, 205, 206] realizándose grandes esfuerzos para el desarrollo de estrategias que permitan el mejoramiento de la síntesis *in vivo* de oSe en plantas de consumo humano [155, 159, 181, 187].

Dada la importancia y complejidad de las rutas de Se en diferentes plantas, se ha introducido el término de Se-metabolómica [184] y se requiere de herramientas de química analítica que permitan la identificación y cuantificación de especies de Se para descifrar el Se-metaboloma.

5.4.2. Metabolitos de selenio reportados en plantas

Además de las formas inorgánicas de Se, las especies de oSe que más frecuentemente son reportadas en plantas incluyen seleno-metilselenocisteína (MeSeCys), γ -glutamil-metil-Se-cisteína (GluMeSeCys), seleno-metionina (SeMet), metil-selenometionina (MeSeMet), seleno-cisteína (Se-Cys), seleno-cistina ($(\text{SeCys})_2$), seleno-lantionina (SeLan) y seleno-homolantionina (SeHLan) [141, 156, 167, 174, 184, 186, 187, 207-209]. Por otro lado, se reporta que las especies principales que se forman en las plantas acumuladoras e hiperacumuladoras, son los compuestos volátiles dimetil selenio (DMSe) y dimetildiselenio (DMDS), respectivamente [135, 145, 167, 184, 209]; otro tipo de especies encontradas en los géneros de plantas *Brassica* y *Allium* son los selenosulfenatos, de fórmula general $\text{RS}_n\text{SeR}'$ (en donde $0 \leq n \leq 2$, R, R' - metil, alil o 1-propenil) [210, 211]. El Se^0 y sus distintas nanoformas son reportadas como metabolitos de Se en plantas, y pueden estar relacionados también a los microorganismos de la rizósfera [212, 213]. Algunas de las especies antes mencionadas son productos derivados de la ruta biológica de la metionina, en la cual pueden participar los Se-análogos de la cisteína y de la metionina. La participación de la ruta de metionina en el metabolismo del Se en plantas superiores ha sido respaldado por el hallazgo de adenosil-Se-homocisteína (Ado-Se-Hcy) y adenosil-Se-metionina (Ado-SeMet) en extractos de germen de trigo [214]. Algunos otros autores reportan además la presencia de Se incorporado en mono y disacáridos en trigo, arroz y maíz enriquecidos con Se [215], y la creciente evidencia en el análisis de especies

Brassica apuntan a la formación de glucosinolatos y tiocianatos con Se incorporado en sus estructuras [167, 216].

5.4.3. Análisis de metabolitos de selenio en plantas

El pretratamiento de muestra es el paso crucial en el análisis de especies de Se en plantas, y dependiendo de los compuestos de interés, se utilizan diversos procedimientos, como se muestra en la Fig. 3.4. La mayoría de los metabolitos de Se tienen propiedades polares o existen como especies con carga (dependiendo de las condiciones de pH), por lo que su extracción de los tejidos de plantas se ha llevado a cabo con agua pura [203, 204, 217], soluciones acuosas de ácido fórmico o clorhídrico diluidos [187, 212, 218], amortiguadores de acetato, amortiguadores con TRIS [215], o con mezclas agua-metanol [167]. Para mejorar la eficiencia de la extracción se ha incluido el uso de agua caliente o procesos de sonicación [169, 176, 215]. Los metabolitos de Se han sido extraídos de hojas de cebolla, por ejemplo, con metanol:cloroformo:agua (12:5:3) y con 0.4 M ácido perclórico:etanol (8:2), para permitir la precipitación de proteínas y así eliminarlas [219]. Para poder extraer compuestos asociados a Se (péptidos o aminoácidos) y escindirlos de las proteínas, la hidrólisis enzimática ha sido una práctica habitual; aunque estos procedimientos no pertenecen a estudios metabolómicos, a menudo se han utilizado enzimas proteolíticas para la caracterización de compuestos de Se unidos y no-unidos a proteínas en una misma corrida analítica [156, 166, 173, 176, 207, 220], aunque también se han utilizado otras enzimas para separar los metabolitos de estructuras celulares [204]. También se ha investigado la determinación de Se elemental potencialmente presente en el residuo insoluble, y para este objetivo se han usado extracciones con soluciones de sulfito de sodio para producir selenosulfato soluble [212, 221]. Por último, los compuestos volátiles son analizados normalmente después del muestreo en “headspace” mediante SPME [191, 210, 211].

En la Fig. 3.3 se delimitan las diferentes configuraciones instrumentales utilizadas en análisis metabolómicos de plantas expuestas a Se. Las técnicas híbridas basadas en cromatografía de líquidos (LC) y espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) son los estándares “dorados” para la especiación de Se en extractos líquidos de plantas en caso de que la identidad de los compuestos a los que está dirigido el análisis sea conocida, y existan estándares auténticos disponibles [222]. El ICP-MS ofrece muchos beneficios como herramienta de detección, no sólo por su gran sensibilidad, bajos límites de detección, nulos interferentes químicos, capacidades multielementales e isotópicas, sino porque su acoplamiento con distintas escalas de separación cromatográfica es relativamente sencillo [209, 223, 224]. No obstante, los isótopos de Se sufren de interferencias poliatómicas que requieren ser eliminadas mediante celdas de reacción de colisión, triple cuadrupolo, instrumentos de alta resolución, o mediante la aplicación de ecuaciones de corrección [222, 224-227]. Por otro lado, el carácter multi-isotópico del Se permite la aplicación de técnicas de dilución isotópica para mejorar el análisis, y además permiten estudiar y comparar el destino de diversos compuestos de Se en las plantas, mediante la introducción de especies marcadas isotópicamente [203, 204, 228]. La cromatografía de líquidos brinda una amplia variedad de modos de separación con un amplio rango de columnas y prácticamente infinitud de combinaciones de fases móviles y condiciones de elución. En el caso de los metabolitos de Se en plantas, se han utilizado prácticamente todos los modos de separación cromatográfica [209]. Es posible que la técnica más común de separación utilizada sea la cromatografía de fase inversa con pares iónicos; a pH relativamente bajos (< 4.5), los ácidos alquilsulfonados, ácido heptafluorobutírico o ácido cítrico

[221, 229, 230] han sido utilizados como agentes de pares iónicos, mientras que a pH mayores, que son valores que provocan la formación de especies aniónicas, se ha empleado hidróxido de tetrabutilamonio [226]. La aplicación de columnas de intercambio aniónico [156, 182, 221, 227] y catiónico [221] han sido reportadas, preferencialmente en modos de elución isocrática para mantener la cantidad de sólidos totales que ingresan al plasma relativamente baja y constante [209]. La cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (HILIC) también ha sido explorada, específicamente en análisis de Se-azúcares [215], iSe y Se-aminoácidos [231]. Para la separación de especies de iSe y Se-aminoácidos, algunos autores han utilizado columnas multi-modo de exclusión por tamaño molecular [184, 203].

ICP es un tipo de ionización fuerte que es altamente recomendada para análisis cuantitativos por espectrometría de masas, aunque no es capaz de identificar especies ni de caracterizar su estructura. Para estos propósitos se requiere de fuentes de ionización suave, que preserven la estructura molecular (principalmente electronebulización-ESI) [232]. La caracterización estructural depende de la medición de la masa exacta, de la consistencia entre los patrones isotópicos experimentales e *in silicio* y del patrón de fragmentación obtenido mediante espectrometría de masas tandem (MS/MS). Para lograr estos requisitos, se utilizan instrumentos de alta resolución, como aquellos equipados con filtros de sector magnético/electrostático, Orbitrap, dispositivos cuadrupolo tiempo de vuelo (Q-TOF), o filtros de masa por resonancia de ciclotrón iónica con transformada de Fourier (FT-ICR) [166, 167, 233]. En cuanto a las técnicas híbridas de cromatografía de líquidos con ionización suave y espectrometría de masas de alta resolución, las columnas capilares o nano de fase inversa son utilizadas con ácidos volátiles o amortiguadores (basados en ácido fórmico o acético) en la preparación de muestras y también como fases móviles [221, 234]. En algunos estudios, ICP-MS, y ESI-MS - MS/MS han sido aplicadas de forma paralela como herramientas complementarias; la primera de ellas asegura una alta sensibilidad y especificidad de cuantificación de Se, mientras que la segunda proporciona datos de la estructura molecular de sus especies [141, 167, 182, 216]. Otra técnica utilizada habitualmente en el análisis de compuestos de Se, consiste en analizar extractos de muestras mediante cromatografía de líquidos con una salida doble de la columna cromatográfica (conexión tipo T), de tal forma que una parte de la salida de la columna ingrese en el ICP-MS para detectar de forma sensible las fracciones de compuestos de Se, y la segunda salida sea utilizada para recolectar las fracciones eluidas; posteriormente se liofilizan cada una de las fracciones recuperadas, y finalmente son reconstituidas en un amortiguador adecuado para su correcta identificación utilizando análisis de espectrometría de masas y espectrometría de masas tandem (MS/MS) [156, 235].

Se han reportado varias combinaciones de cromatografía de gases (GC) con espectrometría de masas atómica o molecular en estudios de Se en plantas (Fig. 3.3), enfocadas principalmente en las especies volátiles [191, 210, 211] así como en el análisis de Se contenido en productos de la hidrólisis de derivados de mirrosinasa en plantas selenizadas del género *Brassica* [216, 236]. Los Se-aminoácidos también pueden determinarse por GC-MS/MS posterior a su derivatización con alquil cloroformatos y utilizando SPME [237].

Es destacable mencionar la aplicación de cromatografía-espectrometría de masas tandem con propósitos cuantitativos basado en el principio de monitoreo de reacciones múltiples (MRM), tal es el caso de la cuantificación de Se-aminoácidos en brotes de frijol mungo [238], MeSeCys y SeMet en soja [166] o en papas Se-enriquecidas [237].

Además, se ha dedicado un esfuerzo considerable para obtener información cualitativa y cuantitativa de especies de Se directamente en los tejidos de la planta (*in vivo*). Debido a que el pretratamiento de muestra es una fuente potencial de errores, ya sea por la posible degradación o interconversión de especies, o por obtener una extracción poco eficiente, es deseable desarrollar técnicas que eviten pretratamientos de muestra. En este sentido la espectroscopía de absorción de rayos X (específicamente XANES) es utilizada con frecuencia [207, 212, 239, 240], debido a que permite evaluar la identidad, carga formal y ambiente de coordinación de distintos compuestos, y además permite la localización de especies específicas en la planta [240]. No obstante, el poder de detección de XANES es relativamente bajo, además, para poder confirmar especies mediante esta técnica, se requiere comparar mediante algoritmos matemáticos la concordancia entre los espectros obtenidos de manera experimental con respecto a espectros de estándares auténticos disponibles; debido a estos factores, la técnica puede llegar a ser muy limitante.

La especiación de compuestos de Se conocidos se encuentra dentro del dominio de la metabolómica dirigida, mientras que los estudios enfocados en obtener el perfil e identificar moléculas pequeñas de Se puede ser clasificado como enfoques semi-dirigida o dirigida, como se muestra en la Fig. 3.4. Al analizar metabolitos de Se con ayuda de espectrometría de masas, se ha utilizado ampliamente el patrón isotópico característico de Se así como su defecto de masa para extraer iones de importancia [167, 210]. Aunque estas características del Se son muy útiles, para la identificación contundente de un compuesto dado, se deben proporcionar todos los componentes de la caracterización estructural y además se debe confirmar la presencia de este compuesto en una muestra mediante la adición de un estándar auténtico.

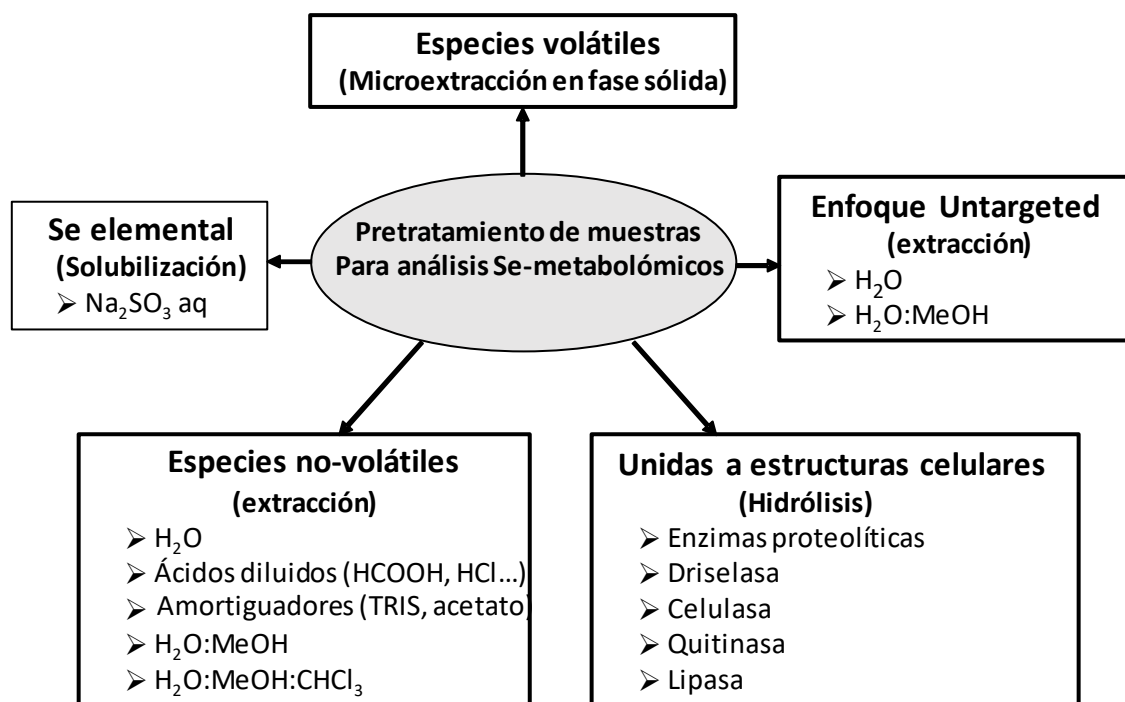


Fig. 3. 4: Esquema general de los procedimientos de pretratamiento de muestras utilizado en Se-metabolómica

5.5. Estudio del impacto de selenio en plantas a nivel del metaboloma

5.5.1. Respuesta bifásica de selenio en plantas

Además de la metabolización del Se, durante la exposición de plantas superiores a dicho elemento se activan diversas defensas y respuestas de tolerancia, dependiendo del tipo de planta, así como de la forma del Se y su concentración. A menudo se observa una respuesta bifásica, en la cual, a bajos niveles de concentraciones de Se hay un mejor crecimiento de las plantas, mientras que a concentraciones altas, se inhibe el crecimiento y se presentan efectos tóxicos; a esta situación se le denomina hormesis y es común para distintos elementos tóxicos [241]. Específicamente, a bajas concentraciones de Se ocurre un aumento en la actividad antioxidante y en el potencial de la planta para adaptarse al estrés biótico o abiótico, y como se ha descrito previamente, se ha demostrado que algunos metabolitos de Se presentan efectos benéficos en plantas [147]. Por otro lado, las altas concentraciones de Se son bien toleradas en plantas acumuladoras e hiperacumuladoras, pero provocan efectos adversos en plantas susceptibles a Se. Los mecanismos subyacentes de la resistencia al Se y de su fitotoxicidad han sido estudiados mediante análisis bioquímicos, transcriptómicos [147, 159, 242-246] y proteómicos [163, 172, 247-250] tanto en plantas silvestres como en aquellas modificadas genéticamente. En contraste, las herramientas metabolómicas han sido relativamente menos utilizadas en estudios de plantas expuestas a Se [153, 162, 164, 165, 172, 218, 250-255], aunque este componente “ómico” es importante dentro del contexto de la respuesta bifásica debida a la exposición de Se en plantas. De hecho, la determinación individual de especies o de un grupo de compuestos, así como la obtención del perfil de metabolitos, proporciona información del fenotipo molecular de las plantas bajo estrés a Se en tiempo real; ambos aspectos son trascendentes debido a que la respuesta de plantas es rápida a nivel de metabolitos en comparación con el nivel transcriptómico y que puede variar dependiendo del compartimento biológico [256]. Las principales herramientas analíticas utilizadas en estudios de metabolitos de plantas expuestas a Se están representadas en la Fig. 3.3, y algunos ejemplos de estos estudios se muestran en la Tabla 3.1. En las secciones 4.5.2 a 4.5.5 se presenta una breve discusión del análisis de metabolitos y de la relevancia biológica de los datos que se obtienen por estos medios

Tabla 3. 1: Esquema general de estudios recientes en la evaluación del impacto de Se en el metabolismo de plantas

Especie de planta (Familia)	Condiciones de exposición (Parte morfológica)	Metabolitos (técnicas analíticas)	Contexto del estudio	Referencia
<i>Brassica oleracea</i> (Brassicaceae)	0-5.2 mM Se(IV); experimento en macetas; 10 días. (Floretes)	Aminoácidos libres (GC-MS); S-Alqu(en)ilcisteína Sulfóxidos (GC-FID, GC-MS).	Alimento funcional	[257]
<i>Brassica oleracea</i> (Brassicaceae)	0-10000 mgSe kg ⁻¹ ; experimento en suelo; hasta que las cabezas fueron completamente formadas. (Cabezas de la col)	Fenoles (HPLC-DAD, HPLC-ESI(-) - ITMS/MS); Ácidos fenólicos (HPLC-DAD); Sulforafano (GC-FID).	Alimento funcional	[251]

Tabla 3.1 (Continuación): Esquema general de estudios recientes en la evaluación del impacto de Se en el metabolismo de plantas

Especie de planta (Familia)	Condiciones de exposición (Parte morfológica)	Metabolitos (técnicas analíticas)	Contexto del estudio	Referencia
<i>Chicorium Intybus L. Lactuca sativa L.</i> (Asteraceae)	0.5, 1.0 mgSe L ⁻¹ Se(VI); hidroponia; almacenamiento en recipientes cerrados de polietileno. (Hojas)	C ₂ H ₄ (GC-FID)	Actividad benéfica a la salud; Alimento funcional	[258]
<i>Triticum aestivum</i> (Poaceae)	100 μM Se(VI); hidroponia; 2 días. (Semillero)	Malondialdehído (S); Azúcares solubles (S); Almidón (S); Glutación (S); Ascorbato (S).	Defensa de la planta	[259]
<i>Lepidium sativum</i> (Brassicaceae)	0-2.0 mgSe L ⁻¹ Se(IV) y/o Mn, Cu, Zn, Se, Mo, Cd (ICP-MS); 0-2.0 mgCd L ⁻¹ Cd(II); hidroponia; 12 días. (Semillero)	Ácidos grasos GC-FID); Malondialdehído (HPLC-FLD).	Respuesta bifásica; Defensa de la planta; Papel protector de Se contra Cd(II)	[260]
<i>Lepidium sativum</i> (Brassicaceae)	0-5.0 mgSe L ⁻¹ Se(IV) y/o 0-2.0 mgCd L ⁻¹ Cd(II); hidroponia; 12 días. (Semillero)	Glioxal, Metilglioxal (HPLC-FLD).	Toxicidad de Se; Defensa de la planta	[261]
<i>Lepidium sativum</i> (Brassicaceae)	0-5.0 mgSe L ⁻¹ Se(IV) y/o 0-2.0 mgCd L ⁻¹ Cd(II); hidroponia; 14 días. (Semillero)	Se, Cd (ICP-MS); fenoles (GC-FID, HPLC-DAD/FLD).	Respuesta bifásica; Defensa de la planta; Papel protector de Se contra Cd(II)	[262]
<i>Arabidopsis thaliana, Brassica oleracea</i> (Brassicaceae)	0-3.2 mgSe L ⁻¹ or 37 mgS L ⁻¹ o 0.8 mgSe L ⁻¹ + 37 mgS L ⁻¹ ; hidroponia; 28-30 días. (Semillero)	Glucosinolatos (HPLC-DAD); Isotiocianatos (GC-FID, GC-MS)	Actividad benéfica a la salud	[263]

Tabla 3.1 (Continuación): Esquema general de estudios recientes en la evaluación del impacto de Se en el metabolismo de plantas

Especie de planta (Familia)	Condiciones de exposición (Parte morfológica)	Metabolitos (técnicas analíticas)	Contexto del estudio	Referencia
<i>Solanum lycopersicon</i> L. (Solanaceae)	0-100 μM Se(IV); hidroponia; 1 y 5 días. (Semillero) Experimentos en maceta (40 días); aplicación foliar de Se(IV). (Hojas, raíces, frutas)	Se, S, Mo, Mn, Mg, Ca, Fe, Cu (ICP-OES); N, C (EA): Se(IV), S(IV) (IC-CD); tioles de bajo peso molecular (HPLC-FLD); Polifenoles (HPLC-DAD, HPLC-ESI(-)-ITMS y MS/MS); Carotenoides (HPLC-DAD, HPLC-APCI-ITMS)	Alimento funcional	[252]
<i>Lycium chinense</i> (Solanaceae)	0-50 mgSe kg ⁻¹ Se(IV); cajas con contenido de perlitas; hasta que las hojas alcanzaron 20 cm. (Hojas)	Se (ICP-MS); Polyfenoles: ácido clorogénico, quercetina, kaempferol, (HPLC-UV, HPLC-APCI-ITMS); Carotenoides (S); Clorofilas: a, b, c (S).	Alimento funcional	[264]
<i>Brassica napus</i> (Brassicaceae)	50 μM Se(IV); hidroponia; 3 y 7 días. (Raíces)	Se, S (ICP-MS); Clorofila, Antocianina (S); Aminoácidos libres (AA-analyzer); metabolitos del ciclo de los TCA: glutamato, piruvato, ascorbato (GC-MS); Azúcares: sucrosa, glucosa (K); APT (K); NADPH (K); Glutación (S); Visualización of ROS (prueba fluorescente).	Toxicidad del Se Defensa de la planta	[250]
<i>Triticum aestivum</i> L., cv. Zyta (Poaceae)	15 μM Se(IV) o 50 μM Ni(II) o Se(IV)+Ni(II); hidroponia; 7 días. (Semillero)	Fosfolípidos (HPLC-QTRAP-MS y MS/MS).	Toxicidad de Se, Ni	[255]
<i>Brassica</i> (Brassicaceae)	50 μM Se(IV); aplicado repetidamente cada 24 h; 7 días. (brote)	Glucosinolatos (HPLC-DAD, HPLC-ESI(+)-QTOF-MS and MS/MS); Aminoácidos y MeSeCys (capHPLC-DAD)	Alimento funcional	[218]

Tabla 3.1 (Continuación): Esquema general de estudios recientes en la evaluación del impacto de Se en el metabolismo de plantas

Especie de planta (Familia)	Condiciones de exposición (Parte morfológica)	Metabolitos (técnicas analíticas)	Contexto del estudio	Referencia
<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>Rapa</i> (Brassicaceae)	25 μM SeO_2 ; experimento en macetas en invernadero; exposición de 7-días. (Semillero)	Glucosinolatos (capHPLC-ESI(+/-)-TQMS); Luteína (HPLC-DAD); fenólicos de bajo tamaño (HPLC-DAD); fenólicos totales y flavonoides totales (S); Malondialdehído (S); Clorofila (S); Antocianinas (S); H_2O_2 (S)	Actividad benéfica a la salud; Defensa de la planta	[265]
<i>Arachis hypogaea</i> L. (Fabaceae)	0-6 mgSe L^{-1} Se(IV); macetas con arena de cuarzo, 2-8 días. (Partes aéreas, raíces)	H_2O_2 (K); NO (K); Flavonoides totales (S); Ácidos fenólicos (HPLC-DAD); Lignina (S).	Defensa de la planta	[150]
<i>Brassica oleracea</i> (Brassicaceae)	100 μM Se(IV) o 100 μM Se(VI); 5 días de germinación. (Brotos)	Se (AFS); S (ICP-OES); Ascorbato (HPLC-UV); Antocianinas (S); Fenólicos totales (S); Flavonoides (S); Glucosinolatos (S); Sulfurofano (HPLC-DAD)	Actividad benéfica de la salud; Alimento funcional	[266]
<i>Solanum lycopersicon</i> L. (Solanaceae)	1.0 mgSe L^{-1} Se(VI); Experimentos en invernadero; Hasta alcanzar la madurez de los frutos. (Flores, frutos)	C_2H_4 (headspace GC-FID); CO_2 (IR analizador de CO_2); Ascorbato (S); H_2O_2 (K); Glutación total y reducido (K).	Actividad benéfica de la salud; Alimento funcional	[267]
<i>Oryza sativa</i> (Poaceae)	0-1.5 mM Se(VI); hidroponia; 5 días. (Semillero)	Malondialdehído (S); H_2O_2 (S); Prolina (S); Azúcares solubles (S); Clorofila y carotenoides (S); Ascorbato (S); Glutación (S); Metilglioxal (S).	Toxicidad de Se; Defensa de la planta	[268]
<i>Cicer arietinum</i> L. (Fabaceae)	1 or 2 mg Se as Se(IV); Rociado de Se durante 24 - 96 h de la germinación. (Brotos)	Isoflavonas: agliconas y glicósidos (HPLC-DAD, HPLC-ESI(+)-TOFMS)	Alimento funcional	[269]

Tabla 3.1 (Continuación): Esquema general de estudios recientes en la evaluación del impacto de Se en el metabolismo de plantas

Especie de planta (Familia)	Condiciones de exposición (Parte morfológica)	Metabolitos (técnicas analíticas)	Contexto del estudio	Referencia
<i>Brassica oleracea</i> (Brassicaceae)	0-0.5 mM Se(IV); Experimento en macetas; Rociado de Se en floretes; 4 semanas. (Floretes)	Se, S (ICP-MS); Glucosinolatos (HPLC-DAD); MeSeCy (HPLC-ESI(+)-trampa de iones lineal MS/MS).	Defensa de la planta	[162]
<i>Brassica oleracea</i> (Brassicaceae)	10, 55, 100 μ M Se(VI); Experimentos en macetas; Aplicación foliar; 10 semanas. (Floretes)	Polifenoles totales (S); MeSeCys (HPLC-FLD); Sulforafano (HPLC-DAD); Glucosinolatos totales (S).	Alimento funcional	[254]
<i>Solanum lycopersicon</i> L. (Solanaceae)	1 mgSe L ⁻¹ Se(VI); Experimentos en invernadero, hasta maduración de frutos. (Frutos)	Se, K, Ca, Fe (ICP-MS); Azúcares: glucosa, fructosa (HPLC-RID); Ácidos orgánicos: ácido málico y cítrico (HPLC-DAD); Aminoácidos (AA-analyzer); Flavonoides totales (S); Glutación (S); Licopeno (S); Vitamina E (HPLC); Vitamina C (F).	Alimento funcional	[163]
<i>Glycine max</i> (Fabaceae)	32 mgSe L ⁻¹ Se(IV), Rociado de Se durante 48 h de germinación. (Brotos)	Isoflavones (HPLC-DAD, HPLC-ESI(+)-TOFMS)	Alimento funcional	[253]
<i>Brassica oleracea</i> (Brassicaceae)	25 μ M Se(IV); 7-días. (Brotos, hojas) 25 μ M (Se(IV); hidroponia. 1.5 mM Se(IV); Experimentos en macetas en invernadero; Hasta maduración de floretes. (Floretes)	Se, S (ICP-OES); Glucosinolatos (capHPLC-UV, UPLC- ESI-QTOFMS); Aminoácidos libres (HPLC-DAD)	Toxicidad de Se; Defensa de la planta	[172]
<i>Nicotiana tabacum</i> (Solanaceae)	0-20 mgSe L ⁻¹ Se(IV) y diferentes combinaciones de ácido indol-3-acético y ácido naftilftalámico o fosfato. (Partes aéreas, raíces)	Se (AFS); P (S); Ácido indol-3-acético (HPLC-DAD).	Defensa de la planta	[270]

Tabla 3.1 (Continuación): Esquema general de estudios recientes en la evaluación del impacto de Se en el metabolismo de plantas

Especie de planta (Familia)	Condiciones de exposición (Parte morfológica)	Metabolitos (técnicas analíticas)	Contexto del estudio	Referencia
<i>Eruca sativa</i> ; <i>Diplotaxis tenuifolia</i> (Brassicaceae)	0-40 μ M Se(IV); hidroponia; 7 días. (Raíces, tallo)	Se, S (ICP-OES); Glucosinolatos (HPLC-ESI(+)-MS y MS/MS); Polifenoles (HPLC-DAD, HPLC-ESI(-)-ITMS y MS/MS); Aminoácidos (HPLC-ESI(+)-ITMS y MS/MS); Tioles de baja masa molecular (HPLC-FLD)	Actividad benéfica de la salud; Alimento funcional	[171]
<i>Cicer arietinum</i> L. (Fabaceae)	0-2.0 mgSe/100 g semillas, Se(IV); 4-días de germinación. (Brotos)	Ácidos grasos (GC-FID); Carotenoides (S); Fenoles totales (S)	Alimento funcional	[165]
<i>Oryza sativa</i> (Poaceae)	10 μ M Se(IV) y/o: 0.1 μ M AVG, 5 μ M ACC, 10 μ M ácido indol-3-acético; hidroponia; 5 días. (Radícula)	3IAA, ACC (capHPLC-ESI-MS/MS); C ₂ H ₄ (headspace, GC-FID); Sucrosa y glucosa (K); Aminoácidos totales (AA-analyzer).	Defensa de la planta	[157]
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Brassicaceae)	30 μ M Se(IV); germinación. (Brotos)	Se (ICP-MS); Citoquininas (ELISA); ROS (Microscopía confocal de escaner laser con prueba espectroscópica fluorescente); Glutación reducido (S).	Defensa de la planta; Alimento funcional	[271]

Técnicas analíticas: S - UV/Vis espectrofotometría, HPLC – cromatografía de líquidos de alta resolución, RID – detector de índice refractivo, ICP-MS – espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inducido, DAD – detector espectrofotométrico de arreglo de diodos, AA-analyzer – analizador de aminoácidos, F - fluorimetría, FLD – detector fluorimétrico, GC – cromatografía de gases, FID – detector de ionización en flama, MS – espectrometría de masas; UV – detector espectrofotométrico en la región UV; APCI – ionización química a presión atmosférica, ITMS – espectrometría de masas con trampa iónica, K – kit comercial, ESI – ionización por electronebulización, ICP-OES – espectrometría de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo, EA – analizador elemental, CD – detector de conductividad, TOF – analizador por tiempo de vuelo, AFS – espectrometría de fluorescencia atómica, QTRAP - triple cuadrupolo lineal con trampa iónica, ELISA – ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

5.5.2. Metabolitos relacionados con respuesta al estrés; marcadores del estrés y moléculas de señalización

En principio, el análisis de metabolitos discutido en esta sección debería pertenecer al enfoque dirigido, sin embargo, debido a que algunos compuestos o grupos de compuestos (peróxido de hidrógeno, tioles, distintos tipos de compuestos fenólicos, entre otros) a menudo son evaluados con la ayuda de kits comerciales o de ensayos espectrofotométricos que presentan baja selectividad, su inclusión en esquemas metabolómicos es discutible. De hecho, como respuesta inmediata de la planta al tratamiento con Se, ocurre un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son evaluadas con mediciones espectrofotométricas de peróxido de hidrógeno [265, 268, 270]. Además, la activación de la defensa antioxidante se evalúa al determinar el glutatión o el total de tioles de baja masa molecular, ascorbato y/o vitaminas (E, C), y los datos obtenidos son complementados por mediciones de la actividad de enzimas antioxidantes (familias de peroxidases y/o reductasas) [163, 171, 252, 259, 266-268].

Dependiendo del grado de formación de ROS, de la eficiencia de la defensa antioxidante y de la susceptibilidad de la planta, las ROS pueden ser utilizadas como moléculas de señalización en la activación de rutas metabólicas en respuesta al estrés, incluyendo la biosíntesis de fitohormonas; por otro lado, un exceso de ROS producirá daño oxidativo, con una gran cantidad de biomarcadores disponibles para verificar este hecho. En ambos casos, varios metabolitos son de gran interés en el análisis metabolómico. Las fitohormonas en plantas expuestas a Se han sido estudiadas principalmente a nivel transcriptómico [243, 272], pero los estudios para su determinación mediante herramientas de química analítica han sido escasos [157, 258, 267, 270]. El etileno ha sido analizado utilizando HS-SPME y detectado posteriormente mediante GC-FID [157, 258, 267]; para el caso de citoquininas, se han utilizado ensayos ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) [271], mientras que la determinación de otros compuestos continúa siendo retardador, debido a las bajas concentraciones y a la falta de propiedades fisicoquímicas distintivas que permitan una separación eficiente de otros compuestos presentes en matrices biológicas químicamente complejas [273]. Posterior a la extracción con solvente, el ácido indol-3-acético (3IAA) y el 1-amino-ciclopropano-carboxilato (ACC), el cual es un precursor de etileno, han sido determinados mediante RP-HPLC-MS/MS con MRM, utilizando analitos deuterados como estándares internos [157]. Por otra parte, en el mismo trabajo se utilizó el sistema HPLC con detección espectrofotométrica por arreglo de diodos (DAD) para la determinación de auxinas, para lo cual el extracto de planta fue purificado utilizando cartuchos de SPE (OASIS HLB) [270]. En cuanto a la relevancia biológica de los resultados reportados, las fitohormonas en respuesta al estrés son más abundantes en plantas resistentes al Se y su biosíntesis es sobre-regulada en la exposición a Se. En particular, se ha propuesto que el ácido jasmónico y el etileno podrían estar implicados en el mejoramiento de la captación y asimilación de sulfato/selenato y en consecuencia, en el mecanismo de resistencia en plantas [147, 243, 272, 274]. Cabe destacar que el etileno es biosintetizado a partir de la metionina a través de ACC como intermediario; debido a que el Se no se incorpora de forma específica a la metionina, las formas libres de este aminoácido disminuyen en la exposición a Se, lo cual se asocia con la disminución de la producción de etileno, confiriéndole un mayor tiempo de vida a los vegetales enriquecidos con Se [258, 267]. Otro efecto de Se en auxinas endógenas y en citoquininas ha sido asociado con la inhibición de la elongación de raíces primarias y la alteración de la arquitectura de las raíces, lo cual podría ser considerado como una aclimatación de la planta a la exposición de Se [243, 275]. En este sentido, se ha reportado la intervención del óxido nítrico (NO) como una molécula de señalización

encargada de sobre-regular la biosíntesis de auxinas y sub-regular las citoquininas, debido a que las especies de Se y su concentración alteran la formación de NO y de otras especies reactivas de nitrógeno [146]. Se ha observado el aumento o disminución de los niveles de NO en raíces, dependiendo de las especies biológicas y de las condiciones de exposición [275, 276], lo que sugiere la intervención de la señalización del NO en la tolerancia de Se en plantas acumuladoras, y también en la Se-toxicidad en el caso de las plantas susceptibles.

En el caso de los marcadores del estrés oxidativo, se ha determinado el malonaldehído como subproducto de la oxidación de lípidos, así como la tasa de insaturación en los ácidos grasos [259, 260, 265, 268]; también se han determinado los niveles de glioxal (GO) y/o metilglioxal (MGO) para evaluar la eficiencia del sistema glioxalasa [261, 268]. Además, el daño a la fotosíntesis por la disminución de los niveles de clorofila ha sido asociado con daños oxidativos, y los pigmentos fotosintéticos han sido evaluados a menudo en plantas expuestas a Se [145, 146, 265, 268]; sin embargo, al igual que para muchos otros parámetros, la síntesis de clorofila depende fuertemente de la dosis de Se administrada [144]. Por ejemplo, en presencia de 5 mg L⁻¹ de Se(IV) se reportó un gran aumento de clorofila a y b en *Lycium chinense* crecida hidropónicamente, y este efecto fue relacionado con el efecto benéfico que confiere el Se en el crecimiento de las plantas, puesto que favorece un flujo eficiente de electrones en la cadena de transporte electrónico [144, 264]. Los carotenos, incluyendo el licopeno, han sido estudiados en plantas expuestas a Se y en la mayoría de los casos su contenido total fue estimado posterior a la extracción con solvente. La detección de carotenos fue basada en la medición de la absorbancia a 450 – 460 nm y a 503 nm en el caso de licopeno [163, 165, 264, 268]. Para la separación de los compuestos el extracto se analizó mediante HPLC en una columna especial “YMC Carotenoid C-30”, se utilizó DAD para realizar la cuantificación mientras que su correcta identificación fue con base en el uso de la espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica y filtro de masas tipo trampa de iones (APCI-IT-MS) utilizando estándares adecuados [252]. Dependiendo del tipo de planta y de las condiciones de estrés de Se, se reportó un aumento, disminución o niveles inalterados de estos pigmentos (Tabla 3.1) Es importante mencionar que los micro y macronutrientes no son considerados metabolitos de plantas, sin embargo, se ha estudiado el efecto que tiene el Se en el tráfico y en el estatus de dichos nutrientes [161, 277]. Debido a la estrecha relación que existe entre el Se y el azufre, estos dos elementos son frecuentemente determinados en plantas expuestas a Se, además existen evidencias que muestran que la concentración de azufre y Se, influyen en la captación y acumulación de metales. De manera específica, se ha reportado un aumento en las concentraciones de macronutrientes como Cu, Zn y Mn en plantas expuestas, y en el caso de la presencia de Se en plantas, se han observado efectos antagonistas en contra de metales pesados como Cd, Pb y Hg [260, 278-281].

5.5.3. Metabolitos primarios

El impacto de Se en el metabolismo primario ha sido estudiado mediante enfoques semi-dirigidos, y los efectos observados varían dependiendo fuertemente del avance del estrés provocado por Se. En la Tabla 3.1 se muestra que los metabolitos de principal interés son aminoácidos, azúcares solubles, almidón y ácidos orgánicos [153, 157, 163, 171, 218, 250, 257, 259, 268]. Como ejemplo, puede mencionarse un estudio realizado en raíces de *Brassica napus* expuestas a Se(IV) [250], en donde la acumulación de superóxido en mitocondrias se vio acompañado por una disminución en la actividad de la aconitasa y la implicación de rutas alternativas de la oxidasa. Se observó un aumento en los niveles de glucosa, 14 aminoácidos (aumento de la razón de cambio en más de 3 para el caso de

alanina, glutamina, cisteína), ácido- γ -aminobutírico y amonio, y la disminución de varios metabolitos del ciclo de los ácidos tricarbónicos (citrato, isocitrato, succinato, fumarato, malato), lo cual indica una adaptación de las plantas al aumento de la demanda de energía provocada por el estrés de Se. El aumento de los niveles de glutatión y los cambios observados a nivel de proteínas, indican además la activación de una defensa antioxidante [250]. En otro estudio, se utilizaron enfoques semi-dirigidos para evaluar cambios en el perfil de fosfolípidos [255]. En este estudio, se expusieron semillas de trigo a Se(IV) y/o a Ni(II), y los extractos fueron analizados mediante HPLC-MS y MS/MS, con lo cual fueron identificados 39 compuestos, encontrándose que el Se, Ni y sus combinaciones, tuvieron una influencia mínima en el perfil de fosfolípidos y en la abundancia de compuestos individuales [255].

5.5.4. Metabolitos secundarios

Se ha demostrado en distintos estudios realizados con diferentes enfoques metabolómicos que el impacto del Se en el metabolismo secundario es importante en la defensa y adaptación de las plantas, además del hecho de conferir propiedades para que la planta tenga potencial de ser un alimento funcional. Se sabe que las rutas metabólicas de azufre y de nitrógeno se alteran en las plantas que son expuestas a Se. En el caso de los metabolitos secundarios de nitrógeno, los compuestos fenólicos, como los fenilpropanoides formados en las rutas del ácido shikímico, son de gran interés, debido a sus conocidas propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y anti-carcinogénicas [282]. El efecto del Se ha sido estudiado en varias plantas naturalmente ricas en compuestos fenólicos, principalmente en diferentes especies de las familias *Brassica* y *Allium* así como en tomate. Se han utilizado ensayos espectrofotométricos para evaluar los cambios totales en los compuestos fenólicos o en sus subgrupos [150, 163, 254, 265, 266] aunque estos ensayos pueden ser clasificados difícilmente como análisis metabolómicos. En cuanto a enfoques dirigidos, los extractos metanólicos o etanólicos que contienen compuestos como ácidos fenólicos pequeños, polifenoles, antocianinas, flavonoides o isoflavonas, han sido sometidos a análisis con RP-HPLC con detección por espectrometría de masas con ionización suave, para su identificación/confirmación, y/o con detección espectrofotométrica para llevar a cabo su cuantificación [150, 165, 171, 251-253, 262, 263, 265]. La respuesta bifásica de plantas fue confirmada también en estos estudios, en los cuales, concentraciones bajas de Se provocaron la síntesis de compuestos fenólicos, mientras que a mayores concentraciones se obtuvo el efecto opuesto (algunos estudios relevantes se muestran en la Tabla 3.1).

Otros productos del metabolismo secundario que poseen azufre y nitrógeno en su estructura son los glucosinolatos; algunas especies de la familia *Brassica* como el brócoli, coliflor, coles de brusela, o repollo contienen de manera natural altos niveles de glucosinolatos. Estos compuestos son biosintetizados a partir de aminoácidos (sobre todo de metionina) por una elongación de cadena y además contienen glucosa unida al átomo de azufre. Las plantas utilizan mirosinasa (enzima de la familia de las hidrolasas glicosiladas) como parte de la respuesta defensiva por estrés, la cual en presencia de agua puede catalizar la liberación de grupos de glucosa, iniciando una conversión rápida a tiocianatos, isotiocianatos y nitrilos. Los productos resultantes propician una defensa en contra del estrés biótico, y son además importantes en el contexto de la salud y nutrición humana. Entre una gran cantidad de glucosinolatos y productos de su hidrólisis, los que más han sido caracterizados y estudiados comprenden varios glucosinolatos aromáticos así como glucorafanina, sulforafano, erucina y alil-glucosinolatos, los cuales son metabolitos derivados de la metionina; muchos de ellos han demostrado tener actividad antioxidante, quimiopreventiva, protección cardiovascular y

antiinflamatoria [283]. Sin embargo, es importante mencionar que el consumo excesivo de glucosinolatos provoca efectos tóxicos tanto en animales como en humanos [284]. En muchos otros estudios, algunos de los cuales se incluyen en la Tabla 3.1, se ha demostrado la influencia de la exposición al Se en la síntesis de glucosinolatos y sus productos de hidrólisis [159, 162, 172, 251, 263, 266], además, se ha propuesto que el Se puede sustituir el azufre en diversas estructuras como en el caso de Se-glucosinolatos, Se-isotiocianatos, Se-tiocianatos y Se-nitrilos [167, 216]. De forma general, la exposición al Se disminuye los niveles de glucosinolatos en diferentes especies de *Brassica* [171, 251, 253, 255], sin embargo, la fortificación con SeO_2 25 μM produjo un aumento de gluconasturtina, glucobrassicinapina y 4-metilglucobrassicina en *Brassica rapa* L. [265]. El efecto del Se no es dependiente únicamente de la concentración, sino que varía dependiendo de la etapa del crecimiento de la planta; en brotes de brócoli, la exposición a Se(IV) 50 μM no afectó los glucosinolatos comparado con los controles no-expuestos, aunque en hojas jóvenes de 3 semanas, los niveles de estos compuestos se vieron claramente disminuidos [263]. Los estudios enfocados en alimentos fortalecidos con Se en el contexto de la salud, enfatizan la importancia de la cuidadosa elección de las condiciones de fertilización para lograr una incorporación eficiente de Se en MeSeCys, cuidando que no se pierdan fitoquímicos importantes como los glucosinolatos [162, 218, 254]. Con respecto a las herramientas analíticas (Tabla 3.1), los metabolitos del grupo de los glucosinolatos han sido determinados mediante enfoques dirigidos, posterior a la extracción con metanol o etanol, desulfonación en una columna DEAE Sephadex A-25 con enzimas sulfatasas y RP-capHPLC con detección por -ESI-MS o con detección espectrofotométrica [171, 172, 218, 265]. Aunado a ello, en el caso de los isotiocianatos, los extractos con diclorometano fueron analizados mediante GC-FID y GC-MS [251, 263]. Por último, los glucosinolatos totales han sido evaluados al medir la glucosa, después de la extracción con metanol acidificado e hidrólisis [254, 266].

La determinación de elementos totales ha proporcionado evidencia sobre la estrecha relación que existe entre los niveles de azufre y Se en plantas; específicamente, a dosis bajas de Se no se observó ningún efecto en el contenido total de azufre en plantas [162, 171, 172, 266], pero a concentraciones elevadas de Se, prevaleció su efecto antagonista con respecto al azufre [244, 250]. Además, se ha documentado que en plantas del género *Allium* fertilizadas con Se, aumenta la acumulación de sulfato, mientras que la abundancia de metabolitos de azufre se ve disminuida [208]. Tal y como se indica en secciones previas, la sustitución no-específica de azufre por Se en aminoácidos se relaciona principalmente con efectos tóxicos en plantas, y por otro lado, la síntesis de especies metiladas de Se es considerado un mecanismo importantes en la tolerancia y adaptación de las plantas [145, 183]. Por otra parte, la disminución de los S-aminoácidos Cys y Met [171, 172] ha sido asociada con alteraciones en la síntesis de S-alqu(en)il-L-cisteína sulfóxidos, los cuales son precursores importantes en el sabor y aroma en plantas de las familias *Allium* y *Brassica* [257, 285]. En un experimento con cebollas expuestas a Se(VI) se observaron distintas características organolépticas, en relación con la alteración de los niveles de los metabolitos γ -L-glutamyl-S-(1-propenil)-L-cisteína sulfóxido, trans-(+)-S-(1-propenil)-L-cisteína sulfóxido, (+)S-metil-L-cisteína sulfóxido y (+)-S-propil-L-cisteína sulfóxido [285].

La discusión anterior sobre la literatura reciente muestra que el impacto de Se en plantas a nivel de metabolitos es muy diverso y no depende únicamente de la susceptibilidad de las especies biológicas hacia el Se, sino de muchos otros parámetros relacionados con las condiciones de exposición, etapa de crecimiento y parte morfológica, como se muestra en la Fig. 3.2. Los análisis metabolómicos de compuestos o de grupos de compuestos específicos proporcionan información importante en el

contexto de la ciencia de plantas, así como en la nutrición y salud humana; no obstante, se requiere de estudios metabolómicos más completos para una mejor comprensión de la función del Se en la totalidad del metaboloma de las plantas. Para este propósito la metabolómica comparativa no dirigida es sin duda un enfoque crucial.

5.5.5. Metabolómica no dirigida

Las herramientas para llevar a cabo metabolómica no dirigida, han estado siendo introducidas cada vez más en las investigaciones del estrés abiótico en plantas, sin embargo, hasta la fecha existen muy pocos estudios que evalúen el metaboloma de plantas expuestas a Se [153, 164, 192]. Uno de estos estudios fue realizado en fresas fortificadas con Se, se obtuvieron extractos metanólicos y se analizaron mediante RP-capHPLC-ESI-Q-TOF-MS [164]; los análisis de los datos, así como la búsqueda en bases de datos permitieron la identificación de varios metabolitos afectados por la exposición a Se en este sistema. Específicamente, en las plantas expuestas se encontraron bajos niveles de N-formil-D-quinurenina y de indolilmetiltiohidroxiamato, los cuales son intermediarios en la biosíntesis de glucosinolatos, y además se observaron bajos niveles de aminoácidos involucrados en el metabolismo del triptófano como por ejemplo S-(indolilmetiltiohidroximoil)-L-cisteína, lo cual indica que el Se produce una alteración en la asimilación y metabolización del azufre. Por otro lado, la ruta de los fenilpropanoides se vio sobre-regulada en las plantas expuestas en comparación con los controles no-expuestos, debido al aumento en los niveles de coumestrol, peonidina, 3-O-(6''-p-cumaril-glucósido) y diosmina. En dicho trabajo se enfatizó que los metabolitos de Se no pudieron ser detectados debido a las condiciones experimentales y analíticas aplicadas [164, 286].

Con el objetivo de evaluar el impacto de Se en el metabolismo primario de las plantas, se ha utilizado el enfoque de metabolómica no dirigida con el uso de GC-MS [153, 192]. En un primer trabajo, se estudió la respuesta de *Arabidopsis thaliana* a la fertilización con Se(VI) [192]. Para ello, se realizó una derivatización con N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) previo al análisis por GC-MS, y con ayuda de bases de datos se lograron identificar 38 compuestos relacionados con el metabolismo primario, cuyos niveles fueron influenciados por la presencia de Se; entre los compuestos identificados que tuvieron mayor abundancia en plantas expuestas se encontraron intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, algunos aminoácidos, azúcares y poliaminas. Se concluyó que la alteración de estos metabolitos primarios permite a la planta mantener los niveles energéticos de ATP en las células, y eliminar las proteínas alteradas por el estrés de Se [192]. En otro trabajo, se aplicó un tratamiento de Se(VI) 100 μ M en brotes de brócoli crecidos hidropónicamente [164]. Los extractos obtenidos de metanol fueron sometidos a derivatización con N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (1% trimetilclorosilano) y se analizaron mediante GC-MS; en este estudio, se identificaron cincuenta metabolitos expresados de forma distinta entre las plantas expuestas con respecto al grupo no-expuesto, de los cuales, los niveles de serina, D-eritronolactona, melezitosa y tirosina aumentaron en el grupo expuesto, mientras que los ácidos D-glucérico, succínico y cítrico se vieron disminuidos en el grupo expuesto. En condiciones de estrés por Se(VI), se observó un aumento en el metabolismo de β -alanina y glutatión, además de que se observó un aumento en la biosíntesis de glucosinolatos, lo cual se atribuyó a la activación de la respuesta adaptativa y antioxidante de la planta. Finalmente, se concluyó que los resultados de metabolómica no dirigida proporcionaron un panorama general del impacto de Se en plantas, y que dichos resultados son importantes para confirmar las hipótesis ya existentes o para la formulación de nuevas hipótesis en la investigación de Se en plantas [164].

Los estudios de metabolómica comparativa no dirigida presentados en esta sección demuestran que, mediante este enfoque, el impacto de Se en distintas rutas metabólicas puede evaluarse en una sola corrida analítica. El análisis de los datos crudos con la ayuda de herramientas adecuadas, proporciona una mayor comprensión del papel de Se en plantas, comparado con los análisis de compuestos o grupos de compuestos específicos, los cuales son realizados comúnmente mediante la ayuda de distintos procedimientos que presentan diferente selectividad y sensibilidad (Tabla 3.1)

5.6. Conclusiones

Los dos aspectos principales que se pueden distinguir en el estudio de plantas expuestas a Se incluyen: (i) elucidación de las rutas de metabolización de Se y (ii) comprensión del impacto de Se en el metabolismo de plantas. Diversos enfoques metabolómicos y herramientas de la química analítica han contribuido substancialmente a avanzar en ambas áreas. Las especies conocidas de Se y los metabolitos específicos de plantas han sido analizados con procedimientos de metabolómica dirigida, proporcionando datos cuantitativos que pueden ser comparados entre plantas expuestas y no expuestas o entre diferentes sistemas experimentales (especies de plantas, condiciones de crecimiento, etc.). Los análisis de metabolómica semi-dirigida han sido de gran utilidad para evaluar los cambios de perfiles de ciertos grupos de metabolitos, tal es el caso de compuestos fenólicos, fosfolípidos o glucosinolatos. En este enfoque, la preparación de la muestra y los ajustes instrumentales pueden ser optimizados de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de los compuestos de interés; por lo general no todos los estándares se encuentran disponibles, pero la detección de metabolitos inesperados o desconocidos es posible. La metabolómica comparativa no dirigida es especialmente adecuada para evaluar cambios a gran escala a nivel del metaboloma en plantas expuestas a Se. Al utilizar el flujo de trabajo de metabolómica no dirigida, los metabolitos afectados por el Se pueden ser identificados y asignados a rutas metabólicas, lo cual facilita la comprensión del impacto que tiene el Se en todo el metabolismo de plantas. Es importante mencionar que la metabolómica no dirigida es retardadora, debido a que la extracción de la totalidad de metabolitos, así como la identificación contundente de todos los metabolitos es prácticamente imposible.

La Se-metabolómica puede ser considerada como un área madura, con una gran cantidad de especies conocidas, herramientas analíticas disponibles para su determinación y con rutas biológicas conocidas que están involucradas en la síntesis de estos metabolitos. En contraste, el impacto de Se en el metaboloma de las plantas permanece bajo investigación. De acuerdo a procedimientos de química analítica, la aplicación de diversos protocolos de preparación de muestra en conjunto con configuraciones disponibles de herramientas como cromatografía y espectrometría de masas además de las plataformas disponibles para el análisis de datos, permiten la detección y anotación de compuestos individuales, así como el análisis de datos, y la evaluación de los cambios en la abundancia de los metabolitos en presencia de estrés por Se. En efecto, es necesario reemplazar los análisis simples de selectividad reducida empleados comúnmente para la evaluación de estos grupos de metabolitos, por herramientas analíticas mucho más avanzadas. La metabolómica no dirigida ha sido muy pocas veces utilizada en este tipo de estudios, pero la obtención de resultados incentiva a la aplicación de este enfoque en otros sistemas experimentales enfocados en el metabolismo de plantas en presencia de Se.

Por último, los estudios metabolómicos discutidos en esta parte del trabajo son relevantes no sólo para ciencias en plantas, sino que también toman una gran relevancia para la nutrición y la salud humana. Los datos obtenidos pueden ser utilizados para establecer condiciones de

crecimiento/exposición proporcionando los niveles deseados de selenio biodisponible y bioactivo, y al mismo tiempo evitando la pérdida en la producción de la planta. En la actualidad, se prefieren dosis relativamente bajas de Se para producir plantas comestibles para que presenten un aumento en las cantidades de aminoácidos libres, proteínas y distintos tipos de fitoquímicos benéficos para la salud. Esta directriz continúa hasta el día de hoy y se requiere realizar investigaciones en el futuro para continuar avanzando en el conocimiento del metabolismo de Se en plantas. Finalmente, es necesario enfatizar que, debido a la importancia del análisis metabolómico de plantas expuestas a Se en la alimentación humana, esta área de investigación pertenece al dominio de foodómica.

6. Capítulo 6: Impacto de Se(IV) en raíces de *Allium cepa* L. a nivel metabolómico

6.1. Análisis de metabolitos mediante GC-MS

La cromatografía de gases (GC) es una de las técnicas más utilizadas en el análisis cuantitativo y cualitativo de compuestos volátiles, semi-volátiles y termoestables. En la GC los componentes de una muestra vaporizada se separan al ser distribuidos entre el gas de arrastre y una fase estacionaria unida al interior de una columna. Las muestras son generalmente inyectadas utilizando microjeringas calibradas para inyectar muestras líquidas a través de un puerto calentado localizado en la parte superior de la columna cromatográfica. Debido a que una inyección lenta o de volúmenes grandes provocan una pobre resolución, los GC pueden utilizar automuestreadores, logrando así resultados más reproducibles [287]. Las columnas capilares requieren la inyección de cantidades pequeñas de muestra, para lo cual a menudo se utilizan separadores de muestra (Split) con lo cual se logra que sólo una pequeña fracción de la muestra sea inyectada. La elución ocurre con ayuda del flujo de un gas inerte, cuya función es transportar al analito a través de la columna y la retención de los compuestos de una muestra en GC se basa en la interacción con la fase estacionaria de la columna, y en el punto de ebullición que presenta cada compuesto, por lo que la columna cromatográfica se encuentra en un horno operado a temperatura programable para lograr el grado de separación requerido [288]. Se han investigado una gran cantidad de detectores en las separaciones de GC, sin embargo, uno de los detectores más poderosos es la espectrometría de masas (MS). Las fuentes de ionización más comunes en los análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) son por impacto de electrones (EI) y de ionización química (CI). En cuanto a los filtros de masas uno de los más utilizados es el cuadrupolo (Q) [289]. Una ventaja importante es que la identificación de los compuestos analizados en GC-EI-MS puede realizarse comparando los espectros de masas obtenidos con espectros de compuestos conocidos contenidos en bibliotecas y bases de datos [290].

La microextracción en fase sólida (SPME) fue desarrollada en 1989 por Pawliszyn et al [291], es una técnica rápida, simple y sin uso de solventes, utilizada en conjunto con GC. La extracción de los analitos volátiles mediante SPME consiste en colocar una fibra de sílice recubierta con fase estacionaria (diámetro de la fibra de 100 – 300 μm) en una muestra acuosa o en la fase gaseosa por encima de la muestra (headspace), durante un periodo de tiempo que asegure el equilibrio de partición de los analitos entre la solución (o fase gaseosa) y el recubrimiento de la fibra [292, 293]. Una vez que los analitos se encuentran adsorbidos en la fibra, se realiza una desorción térmica, utilizando el puerto de inyección de muestras del GC, el cual debe encontrarse a una temperatura elevada (100 – 250 $^{\circ}\text{C}$); con este último proceso se elimina el uso de solventes de extracción [294]. Los analitos desorbidos en el puerto de inyección de muestras son ingresados con ayuda del gas acarreador al interior de la columna, donde ocurre su separación en función de sus respectivas polaridades y puntos de ebullición.

Las fibras de SPME tienen una geometría definida por su forma cilíndrica, lo que permite un mayor acceso para los metabolitos hacia la superficie, en comparación con otras técnicas como por ejemplo empaques de extracción en fase sólida (SPE), facilitando el proceso de extracción y desorción [294, 295]. Los principales parámetros a considerar para realizar la extracción usando fibras de SPME son su estabilidad, polaridad y grosor del recubrimiento.

Los tipos de recubrimientos disponibles comercialmente para SPME son polidimetilsiloxano (PDMS), poli-acrilato (PA), carbowax (CW), divinibenceno (DVB), polidimetilsiloxano (PDMS), carboxeno (CAR), resinas templadas (TPR), [296] polietilenglicol (PEG), entre otras, así como combinaciones de ellas. Cada recubrimiento posee distintas propiedades de polaridad para la extracción de compuestos, y se han desarrollado fibras con distintas combinaciones de materiales que

pueden conferir una polaridad mixta, dependiendo de la aplicación necesaria. Otro factor que depende del material que recubre la fibra, es el intervalo de masa molecular de los compuestos que se pueden extraer [292]. En la Tabla 4.1 se presentan algunas propiedades de los diferentes tipos de recubrimientos y algunas de sus capacidades para aplicaciones de extracción de compuestos volátiles.

Existen dos tipos de recubrimientos en fibras utilizadas en SPME: capas poliméricas (C.p.) y partículas incrustadas en capas poliméricas (P.i.c). Las fibras del tipo C.p. incluyen PDMS, PA y PEG, mientras que las fibras P.i.c incluyen DVB, CAR, o una combinación de ambas. El grosor del recubrimiento de una fibra determina el volumen y el área de la superficie de la fase estacionaria, lo cual influye en la capacidad y velocidad de adsorción [292, 297]. Específicamente, las fibras PDMS más finas, son recomendadas para extraer compuestos con altas masas moleculares, los cuales serán desorbidos más fácilmente de una capa de 7 μm en comparación con una de 100 μm de grosor. Por otra parte, la desorción de fibras incrustadas de partículas requiere una desorción a altas temperaturas para asegurar la desorción inmediata de los analitos volátiles [295, 296].

Tabla 4. 1: Propiedades de algunos tipos de recubrimientos de fibras utilizadas para SPME [292, 293]

Recubrimiento y grosor	Tipo	Intervalo (g/mol)	Polaridad	Condicionamiento (°C)	Desorción (°C)	Uso
PDMS 7 μm	C.P	125-600	Apolar	320	220 - 320	Compuestos apolares de altas masas moleculares
PDMS 30 μm	C.P	80-500	Apolar	250	200 - 280	Compuestos semivolátiles apolares
PDMS 100 μm	C.P	60-275	Apolar	250	200 - 280	Compuestos volátiles
PA 85 μm	C.P	80-300	Polar	280	220 - 280	Compuestos Semi-volátiles polares
CW/PEG 60 μm	C.p	40-275	Polar	240	200 - 250	Alcoholes y compuestos polares
CAR/PDMS 75/85 μm	P.i.c	30 - 225	Mixta	300	250 - 310	Compuestos gaseosos de baja masa molecular
PDMS/DVB 65 μm	P.i.c	50-300	Mixta	250	200 - 270	Compuestos volátiles, aminas y compuestos nitro-aromáticos
DVB/CAR/PDM S 50/30 μm Stableflex fiber	P.c.p	40-275	Mixta	270	230 - 270	Compuestos volátiles y semivolátiles (C3-C20)

C.P.- Capa polimérica. P.i.c- Partículas incrustadas en capas poliméricas

La técnica SPME ha sido combinada rutinariamente con GC-MS aplicándose a una gran variedad de compuestos, en especial para realizar la extracción de compuestos volátiles y semivolátiles de muestras ambientales, biológicas y de alimentos. En este sentido, HS-SPME-GC-MS se ha utilizado en diversos análisis de compuestos volátiles de azufre y de Se, aunque también para realizar análisis de compuestos derivatizados para ser termoestables. Por ejemplo, se han extraído estándares de

Se(IV) y Se(VI) derivatizados con 4-nitro-o-fenilendiamina utilizando SPME y analizando mediante GC-MS [298, 299]. Algunos estudios se han enfocado en la extracción aminoácidos derivatizados con isobutilcloroformatos en el “headspace” de las muestras, utilizando fibras PDMS 100 µm, y se han analizado utilizando GC-MS [300] o en el caso de Se-aminoácidos mediante GC-ICP-MS [301]. Por otro lado, algunos alquil-compuestos volátiles/semivolátiles de azufre y de Se son metabolitos naturales de varios organismos y han sido estudiados en sistemas biológicos mediante extracción en HS y usando fibras para SPME. Se han identificado una gran variedad de metabolitos mono y dialquilados de azufre y de Se utilizando fibras CAR/PDMS 75 µm para SPME en el “headspace” de muestras como bebidas alcohólicas y posterior análisis por GC-AED [302]. Un sistema similar HS-SPME se utilizó en el caso de plantas expuestas a Se (*Brassica juncea* y *Allium fistulosum*) realizando separación/detección de los compuestos mediante GC-Q-TOF [303] o GC-ICP-MS [304]; o en cultivos de *E. coli* enriquecidos con Se(IV) o Se(VI) realizando la separación/detección mediante GC-MS. Algunos de los principales compuestos identificados en estos experimentos fueron: dimetil selenio (DMSe), dimetildiselenio (DMDS), dimetilsulfuro (DMS), dimetildisulfuro (DMDS), trimetilsulfuro (TMS), dipropilsulfuro (DPS), dipropil disulfuro (DPDS), compuestos con azufre y Se, entre otros.

En esta parte del trabajo se realizó el análisis metabolómico comparativo en cultivos hidropónicos de cebollas expuestas a Se(IV) y controles no-expuestas, mediante la técnica GC-MS. Para ello, se obtuvieron perfiles de compuestos volátiles y de compuestos susceptibles a reaccionar con etilcloroformato para formar derivados volátiles/semi-volátiles. En la primera parte, los compuestos volátiles fueron adsorbidos utilizando SPME en headspace, mientras que, en la segunda parte se obtuvieron extractos de raíces y se llevó a cabo la derivatización con etilcloroformato antes de la inyección de la muestra al GC-MS. Para avanzar en el entendimiento del metabolismo de Se y el impacto de este elemento en la planta, se realizó la identificación de metabolitos que presentaron diferentes abundancias en dos tipos de cultivos, utilizando diferentes herramientas de análisis de datos y las librerías de compuestos NIST 02.

6.1.1. Objetivos

El objetivo de esta parte del trabajo consistió en identificar compuestos que diferencien estadísticamente los perfiles metabolómicos de cebollas no-expuestas y expuestas a Se(IV), enfocándose en los metabolitos volátiles y/o susceptibles a la derivatización con etilcloroformato.

6.1.1.1. Objetivos específicos:

- Montar un sistema HS-SPME para extraer los compuestos volátiles generados en cultivos hidropónicos de cebollas.
- Realizar el análisis HS-SPME-GC-MS de cultivos expuestos a Se(IV) y de los controles.
- Analizar y extraer metabolitos de raíces de cebollas no-expuestas y expuestas a Se(IV), realizar su derivatización con etilcloroformato, y analizar los extractos mediante GC-MS y mediante capHPLC-ESI-Q-TOF-MS.
- Identificar los compuestos con más influencia en la diferenciación entre ambos grupos.

6.1.2. Análisis de compuestos volátiles de azufre y selenio utilizando el sistema HS-SPME-GC-TQMS

6.1.2.1. Materiales y métodos

6.1.2.1.1. Instrumentación, reactivos y muestras

Se utilizó un cromatógrafo de gases Bruker 456 acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (Bruker SCION TQ) equipado con automuestreador y utilizando una columna cromatográfica BP-5 MS (30 m x 0.25 mm; 0.25 μm) controlado por el programa Bruker MS Workstation 8.0. La microextracción en fase sólida (SPME) fue realizada utilizando fibras Supelco DVB-PDMS 75 μm , para este análisis se usó un liner de 0.65 mm d.i., y el programa de temperatura de inyección para realizar de desorción de los compuestos.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Se utilizó agua desionizada (18.2 M Ω cm, Labconco). Se utilizaron los siguientes reactivos marca Sigma para los medios Hoagland: Nitrato de calcio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, fosfato monobásico de potasio, nitrato de potasio, ácido bórico, sulfato de manganeso, trióxido de molibdeno, nitrato férrico, nitrato de zinc, sulfato de cobre.

Las muestras de cebolla fueron compradas durante la primavera del 2019 en distintos mercados de la ciudad de Guanajuato, Gto. Las cebollas se mantuvieron a temperatura ambiente, fueron lavadas con agua desionizada, y se prepararon el mismo día para los experimentos realizados.

6.1.2.1.2. Crecimiento de plantas para el análisis por HS-SPME-GC-TQMS

Se utilizaron cebollas con bulbos de aproximadamente 5 cm de diámetro, se lavaron con agua desionizada y se prepararon para inducir un crecimiento homogéneo de las raíces, para esto, se cortaron completamente las raíces, se cortaron las hojas y se realizó un orificio en el tallo modificado de aproximadamente 5 mm de diámetro y de profundidad, como reporta Wierzbicka [305]. Posteriormente se realizaron duplicados para dos grupos de experimentos en los que tres bulbos de cebolla fueron colocados en recipientes de plástico (8 cm de diámetro, 7 cm de altura) y se agregaron 100 mL de medio Hoagland (Ca(NO₃)₂ 0.35 mM, CaCl₂ 2.1 mM, MgCl₂ 0.91 mM, KH₂PO₄ 0.97 mM, KNO₃ 0.26 mM, H₃BO₃ 23 μM , MnSO₄ 3.9 μM , MoO₃ 3.9 μM , Fe(NO₃)₃ 10 μM , Zn(NO₃)₂ 0.37 μM , CuSO₄ 0.44 μM ; pH 5.8 [306]) durante 10 días. Después de este tiempo uno de los grupos permaneció sin-exposición como control y al otro se agregaron 20 mgSe L⁻¹ al medio Hoagland utilizando selenito de sodio pentahidratado como fuente de Se(IV), y la exposición bajo estas condiciones tuvo un periodo de 5 días. Los recipientes fueron completamente sellados después de la exposición, dejando un orificio con parafilm para realizar la extracción mediante SPME.

6.1.2.1.3. Sistema HS-SPME-GC-TQMS

Se realizó la extracción de metabolitos volátiles en el headspace de los grupos de cebollas no-expuestas y expuestas a Se(IV) utilizando SPME posterior a los 5 días de exposición. Para este propósito se utilizaron fibras Supelco tipo polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS-DVB 65 μm) en un porta-fibras (Holder SPME Supelco). Antes del análisis de microextracción, se preconditionó térmicamente la fibra SPME, para esto, el porta-fibras fue colocado en el puerto de inyección del equipo GC-MS (Bruker Scion 456), de tal forma que la fibra se mantuvo a una temperatura de 250 °C durante 7 min. Con la finalidad de evitar que ingresaran posibles contaminantes provenientes de

la fibra en el sistema cromatográfico, durante el acondicionamiento de la fibra, al colocarla en el puerto de inyección del GC-MS se utilizó un primer programa, distinto al usado para los análisis de muestras reales, en el cual se ajustaron los siguientes parámetros del equipo: Split 1:100, gradiente de temperatura del horno de la columna de 40 – 250 °C (5 °C min⁻¹) y el sistema de detección se mantuvo inactivo.

Una vez que la fibra fue activada y acondicionada se procedió, a introducirla completamente en el “headspace” (HS) del cultivo mediante un orificio sellado con parafilm para evitar la pérdida de los compuestos volátiles. La fibra permaneció la fase gaseosa del cultivo durante 1 h. Posteriormente mediante el Holder, la fibra fue ingresada en el puerto de inyección del GC-MS, el cual se configuró para la inyección manual de muestra, ingresando la fibra en el inyector con una temperatura de 250 °C para asegurar la desorción de los compuestos retenidos en la fibra. La fibra se mantuvo en la posición de inyección de durante 7 min. Los parámetros instrumentales del análisis se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4. 2: Parámetros utilizados para el análisis Headspace de cebollas expuestas y no-expuestas mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (HS-SPME-GC-EI-MS)

Parámetro	Valor
SPME	PDMS-DVB 65 µm
Liner	SPME 0.75 mm d.i.
Temperatura del inyector	250 °C
Split	Sin Split (Splitless)
Flujo de gas acarreador (He)	1 mL min ⁻¹
Columna	BP-5 MS (30 m x 0.25 mm; 0.25 µm)
Temperatura de horno	0 – 2 min 35 °C
	2 – 21 min 35 – 200 °C
Temperatura de línea de transferencia	250 °C
Temperatura de fuente de ionización	280 °C
Energía de Ionización electrónica	70 eV
Intervalo de masas	<i>m/z</i> 15 - 400

Los cromatogramas obtenidos fueron revisados manualmente para encontrar las principales diferencias en las señales, además, utilizando el filtro para buscar iones de *m/z* 95 que corresponde a especies metiladas de Se, así como la inspección del patrón isotópico típico de compuestos de Se. La identificación de compuestos se realizó utilizando la comparación de los espectros de masas con la biblioteca NIST 2.0, o en su defecto, se analizaron los fragmentos para elucidar su estructura.

6.1.2.2. Resultados y discusión

6.1.2.2.1. Identificación de compuestos volátiles de azufre

Los cromatogramas obtenidos para plantas expuestas a Se(IV) y plantas control fueron procesados mediante MS Data Review (Bruker). Los cromatogramas de iones totales fueron filtrados utilizando el ion *m/z* 45 para la exploración de compuestos de azufre (Fig. 4.1). Es importante mencionar que no se utilizó el ion que correspondería al ion [CH₃S]⁺ (*m/z* 47), sino el correspondiente a la especie

$[\text{HC}\equiv\text{S}]^+$ (m/z 45), debido a que, como reporta Swearingen Jr. et al [307], el ion m/z 45 corresponde al fragmento más estable del azufre metilado.

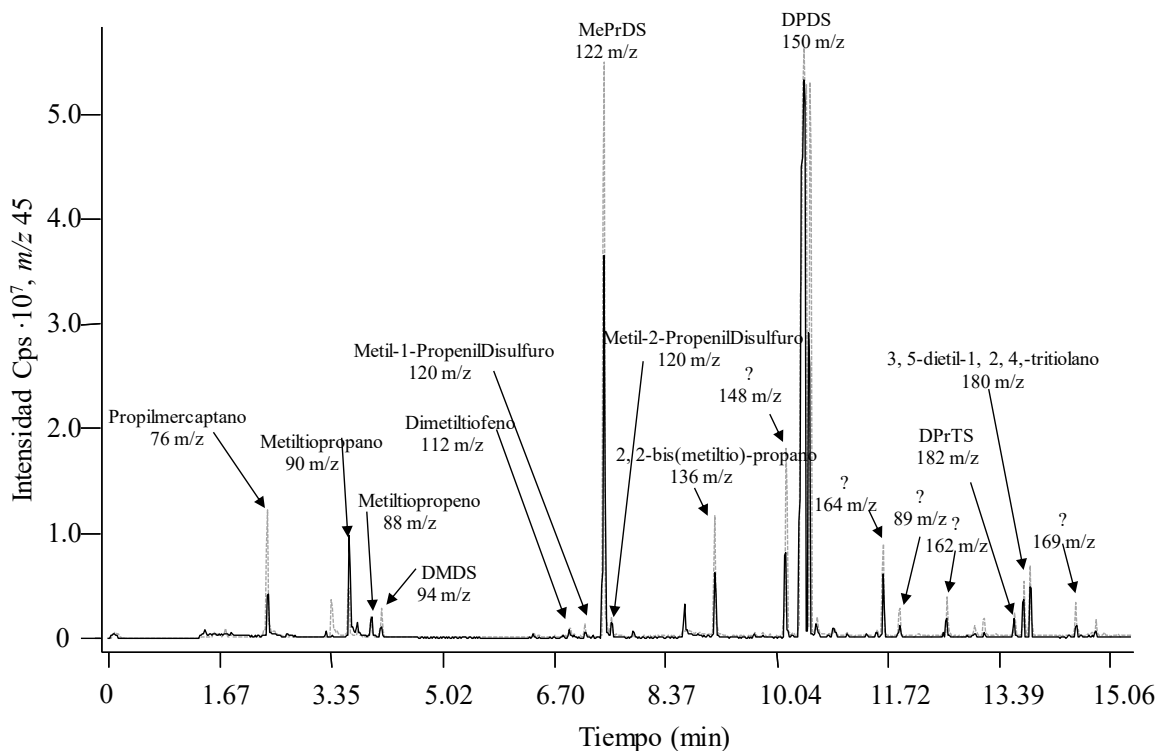


Fig. 4. 1: Cromatograma de ion extraído m/z 45 donde se indican algunos compuestos identificados de azufre. (---) Cebollas control no-expuestas (–) Cebollas expuestas a Se(IV).

Algunos de los metabolitos volátiles de azufre identificados mediante SPME-GC-MS se muestran en la Tabla 4.3 en orden de elución, los cuales fueron anotados con ayuda de la comparación de la biblioteca NIST con un Score de concordancia entre espectros $> 85\%$, aunque también se incluyeron cuatro metabolitos con un score $< 80\%$. Las abreviaciones normalmente utilizadas para los compuestos dialquilados de azufre y selenio son representados por las letras M, D, T para indicar mono, di y tri, respectivamente, mientras que los grupos alquilo son representados como Me, E, Pr, B, Pe para metil, etil, propil, butil y pentil, respectivamente.

Como se muestra en la Tabla 4.3, los metabolitos con mayor cambio en la abundancia en el grupo control con respecto al grupo expuesto a Se(IV), fueron en orden descendente: DPTS; 3,5-dietil-1,2,4-tritriolano; propilmercaptano, metil-2-propenil disulfuro, DMDS, metil-1-propenil disulfuro; 2, 2-bis(metilio)-propano y MPDS, con una razón de cambio > 2 . Se sabe que a concentraciones elevadas de Se, prevalecen efectos antagonistas con respecto al azufre [244, 250]. Además, se ha documentado que en plantas del género *Allium* fertilizadas con Se, aumenta la acumulación de sulfato, mientras que la abundancia de metabolitos de azufre se ve disminuida [308]. Lo anterior coincide con nuestro hallazgo en cuanto a la disminución de los compuestos volátiles de azufre en las muestras expuestas a Se.

En particular, la aliinasa es una de las enzimas responsables de la producción de varios compuestos volátiles de azufre, los cuales provienen de compuestos S-alqu(en)il cisteína sulfóxidos. Por su parte,

estos sulfóxidos son precursores de distintos tiosulfatos de los cuales se producen subsecuentemente compuestos alquilados de disulfuro, trisulfuro, o sulfonados [309]. Aunado a lo anterior, entre los compuestos volátiles de azufre se encontraron dos compuestos de tritiolano (Tabla 4.3), pertenecientes a compuestos cíclicos de azufre. En algunos trabajos se propuso que ciertos compuestos cíclicos de azufre como los tiofenos, podrían ser artefactos, producidos a partir de compuestos alifáticos de sulfuro a altas temperaturas. Por ejemplo, se encontró que al calentar a 85 °C el bis(1-propenil) disulfuro produce el 2-mercapto-3,4-dimetil-2,3-dihidrotiofeno, el cual a su vez podía producir 3,4-dimetiltiofeno o 3,4-dimetil-2-tienildisulfuros [310]. Lo anterior sugiere que uno de los compuestos volátiles mayoritarios de azufre, el DPDS, podría interaccionar con compuestos como el propilmercaptano y producir los compuestos tritiolatos identificados en el grupo de cebollas expuestas a Se (Tabla 4.3), no obstante, para confirmar esta hipótesis se requieren más estudios.

Tabla 4. 3: Compuestos volátiles de azufre identificados en cebollas no-expuestas y expuestas a Se(IV).

Compuesto	TR (min)	Prob. NIST %	Fórmula	Razón de cambio	Regulación
DMS	1.97	92	C ₂ H ₆ S	-	-
Propilmercaptano	2.53	93	C ₃ H ₈ S	4.1	DOWN
Metiltiopropano	3.77	99	C ₄ H ₁₀ S	1.5	DOWN
Metiltiopropeno	3.91	45	C ₄ H ₈ S	1.7	UP
DMDS	4.27	98	C ₂ H ₆ S ₂	3.5	DOWN
Alil propil sulfuro	6.60	82	C ₆ H ₁₂ S	1.7	DOWN
Metil-2-propenil-disulfuro	7.40	68	C ₄ H ₈ S ₂	3.7	DOWN
MPDS	7.69	90	C ₄ H ₁₀ S ₂	2.1	DOWN
Metil-1-propenildisulfuro	7.81	65	C ₄ H ₈ S ₂	3.3	DOWN
2, 2-bis(metiltio)-propano	9.40	82	C ₅ H ₁₂ S ₂	2.2	DOWN
isoPPDS	10.01	55	C ₆ H ₁₄ S ₂	1.8	DOWN
DPDS	10.77	87	C ₆ H ₁₄ S ₂	-	-
DPTS	14.01	96	C ₆ H ₁₄ S ₃	6.2	DOWN
3,5-dietil-1,2,4-tritiolano*	14.15	92	C ₆ H ₁₂ S ₃	5.8	DOWN
Alquil-tritiolano*	14.26	93	C ₆ H ₁₂ S ₃	5.6	DOWN

DOWN- Subregulación, mayor abundancia en el grupo control con respecto al grupo expuesto.

*Estos compuestos fueron identificado como 3,5-dietil-1,2,4-tritiolano con 92 % de probabilidad de concordancia, pero por sus distintos tiempos de retención se propone que exista alguna diferencia en su estructura

Se identificaron cuatro compuestos con una razón de cambio < 2, además de dos compuestos que no presentan cambio entre ambos grupos (DMS y DPDS) (Tabla 4.3), los cuales se muestran con la finalidad de enfatizar la capacidad de este sistema para llevar a cabo la identificación de compuestos volátiles de azufre presentes en el headspace de cultivos de cebollas. Este procedimiento es particularmente importante, porque las metodologías que involucran la extracción de metabolitos volátiles en el headspace de extractos de tejidos de planta o en tejidos de plantas finamente cortados,

implican la descomposición u oxidación de ciertos compuestos inestables, los cuales se evitan al realizar la extracción en plantas *in vivo* mediante SPME.

6.1.2.2.2. Identificación de compuestos de selenio

Para identificar los compuestos volátiles de Se, los cromatogramas obtenidos fueron procesados mediante MS Data Review (Bruker), realizando la filtración de los datos TIC para extraer el ion m/z 95. Dicho ion es un fragmento común de compuestos metilados de Se y corresponde al $[\text{CH}_3^{80}\text{Se}]^+$. Los cromatogramas de ion extraído (EIC) obtenidos para cultivos expuestos a Se(IV) y cultivos control fueron comparados buscando las diferencias existentes entre ambos grupos. Los EIC se presentan en la Fig. 4.2, donde se muestra la presencia de tres picos en los tiempos de retención 2.4, 6.8 y 8.9 min, los cuales aparecen únicamente en los cultivos expuestos a Se(IV).

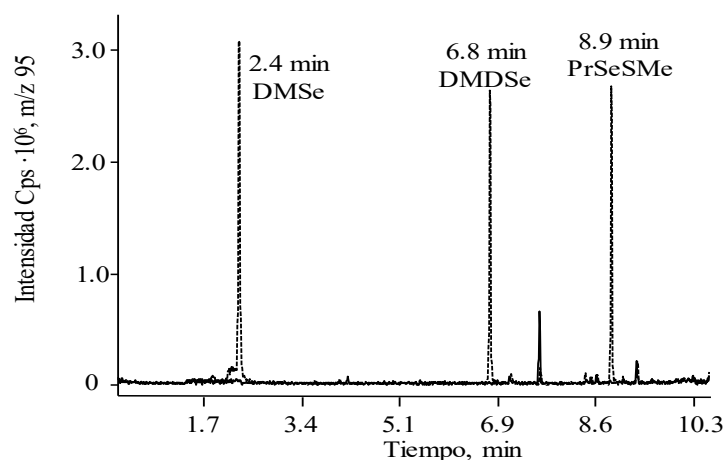


Fig. 4. 2: Cromatograma de ion extraído m/z 95. (-) Cultivos control no-expuestos. (---) Cultivos expuestos a Se(IV). Se observan tres señales que aparecen únicamente en el grupo expuesto, las cuales corresponden en orden de elución a los compuestos DMSe, DMDSe y PrSeSM.

La identificación de compuestos de Se se realizó utilizando los espectros MS de cada una de las tres señales mostradas en la Fig. 4.2 comparando con los datos incluidos en la biblioteca NIST. De ahí, los primeros dos compuestos mostrados corresponden a dimetilselenio (DMSe) y a dimetildiselenio (DMDSe), sin embargo, el tercer compuesto no pudo ser identificado en este procedimiento. La estructura PrSeSM fue propuesta con base en los iones de los fragmentos presentes en los espectros de masa adquiridos en el tiempo de retención 8.9 min. En la Fig. 4.3 se muestran los espectros MS de las tres señales; la identificación en la base de datos NIST se da con respecto al porcentaje con el que coinciden los fragmentos e intensidades de los espectros experimentales y los espectros en la base de datos. En la Fig. 4.3 a y b, se presentan estos datos para las señales con tiempos de retención 2.4 min y 6.8 min comparados con espectros de DMSe (88 % de coincidencia) y de DMDSe (99 % de coincidencia). En la Fig. 4.3 c, se muestra el espectro de masa adquirido para la tercera señal (tiempo de retención 8.9 min) donde se observa claramente el patrón isotópico de Se en todos los iones.

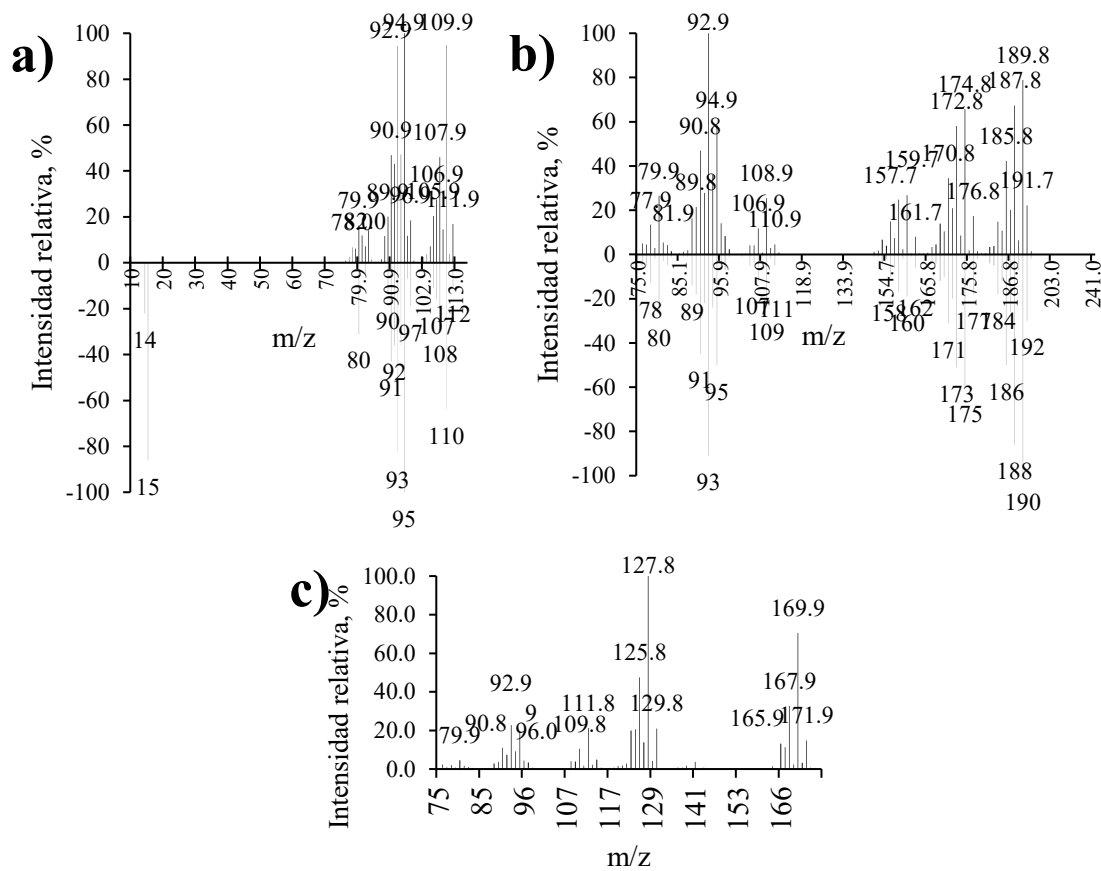


Fig. 4. 3: Espectros obtenidos en GC-MS para las señales encontradas en las cebollas expuestas a Se. a) En la parte superior, espectro adquirido en el tiempo de retención 2.4, en la parte inferior espectro de DMSe de la base de datos NIST. b) En la parte superior, espectro adquirido en el tiempo de retención 6.8, en la parte inferior espectro de DMDSe de la base de datos NIST. c) Espectro de masas adquirido en el tiempo de retención 8.9 min.

Como se mencionó anteriormente, el pico cromatográfico en el tiempo de retención 8.9 min no corresponde a ningún compuesto en la biblioteca NIST, pero es un compuesto de Se. Además de esta señal, y siguiendo el flujo de búsqueda de cromatogramas EIC m/z 95 se lograron detectar tres señales adicionales con tiempos de retención 5.1, 5.5 y 8.5 min, las cuales presentan el patrón isotópico característico de Se, y ninguna pudo ser identificada mediante la biblioteca NIST. Para su identificación, se utilizó el programa AMDIS que asiste en la interpretación de cromatogramas de GC-MS, y además se analizaron los fragmentos de los espectros de masas para elucidar su estructura molecular.

La señal en el tiempo de retención 5.1 min presenta un ion $[M]^+$ m/z 136 con patrón isotópico de Se. Esta masa fue asignada a la fórmula molecular C_4H_8Se mientras que la estructura fue propuesta con base en los iones presentes en el espectro de masas y correspondió al metil alil selenio. La fragmentación propuesta se muestra en la Fig. 4.4; el ion m/z 121 representa la pérdida del grupo metilo, los iones m/z 91, 93 y 95 corresponden a selenio metilado, ya que, como reporta Swearingen Jr. [307], el fragmento de selenio metilado más estable corresponde a la especie $[HC=Se]^+$, asignando

los fragmentos a los iones $[\text{HC}\equiv^{78}\text{Se}]^+$, $[\text{HC}\equiv^{80}\text{Se}]^+$ y $[\text{HC}\equiv^{82}\text{Se}]^+$, respectivamente; y el ion m/z 41 pertenece al grupo alilo de la molécula $[\text{CH}_2=\text{CH}_2\text{CH}]^+$.

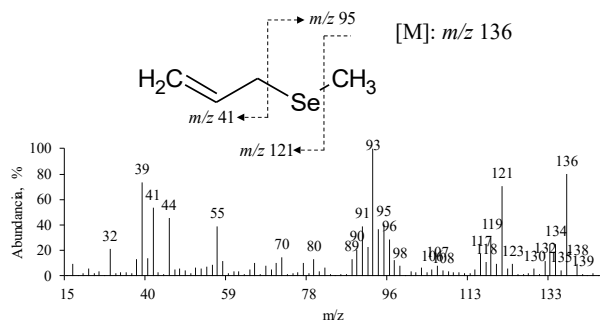


Fig. 4. 4: Espectro de masas y fragmentación propuesta de metilalilselenio ($M^+ = m/z$ 136, TR=5.1 min)

La señal registrada con tiempo de retención 5.5 min contiene un ion molecular con m/z 142 y con patrón isotópico característico de Se. En un reporte, Gabel-Jensen et al. [311] analizan distintas mezclas volátiles de azufre y selenio *in vitro*; en una mezcla de DMDSe y DMDS obtienen mediante HS-SPME-GC-MS un pico cuyo ion molecular tiene un valor m/z de 142 y patrón isotópico de Se (Fig. 4.5 b), el cual es identificado como dimetilselenosulfuro (MSeSM). El espectro que obtuvimos para el pico m/z 142 en el minuto 5.5 coincide con los principales picos mostrados por Gabel-Jensen et al: m/z 80, 91, 93, 95, 125, 127, 129, 140, 142 y 144 y debido a esta coincidencia el analito que se obtuvo fue anotado como MeSeSM y la fragmentación propuesta, así como su espectro de MS se muestran en la Fig. 4.5a.

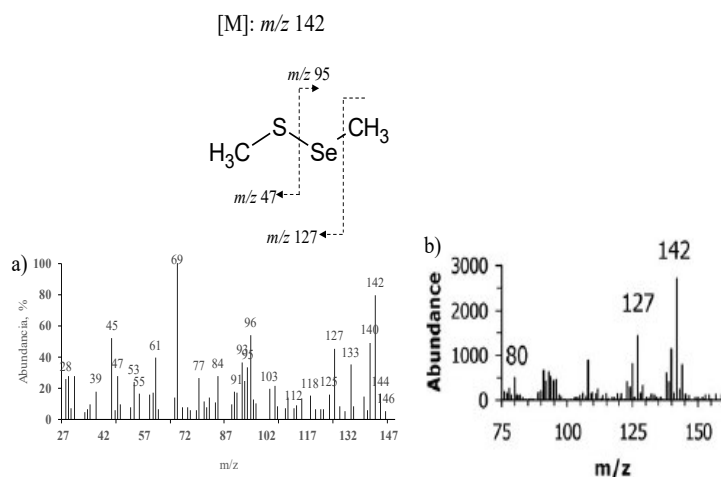


Fig. 4. 5: a) Espectro experimental obtenido para HS de cebollas expuestas a Se(IV) TR: 5.5 min. b) Espectro de masas obtenido por Gabel-Jensen et al para una reacción de DMDSe con DMDS, identificando el compuesto MSeSM ([311])

El pico con m/z 166 en el tiempo de retención 8.5 min tampoco pudo ser identificado por medio de la base de datos NIST. En un reporte de Matich et al. analizan plantas de *N. tabacum* modificadas genéticamente, y expuestas a Se(VI); analizando un extracto de hojas con éter etílico mediante GC-MS, obtuvieron tres metabolitos, cuyos espectros contenían el ion m/z 166 con patrón isotópico

característico de Se; estos metabolitos fueron identificados como distintas isoformas de acetil selenoacetaldehídos ($C_4H_6O_2Se$) [312]. Al comparar los espectros de los selenoacetaldehídos obtenidos por Matich et al, con el espectro de masas que obtuvimos en el tiempo de retención 8.5 min, se nota claramente que nuestro metabolito carece de los iones m/z 80, 106, 124 y 137, descartándose que se trate de este tipo de compuestos. Por lo anterior, al analizar los fragmentos del espectro de MS, se propuso la estructura del metabolito correspondiente al metil-pentilselenio (MPSe) como se muestra en la Fig. 4.6. Como evidencia adicional, se calculó el log P de los compuestos identificados por Matich et al. [312] y para el compuesto propuesto en nuestro trabajo, metil-pentil selenio (MPeSe), obteniéndose valores que indican una alta polaridad para los selenoacetaldehídos, log P: 0.35, 0.50, -1.3, respectivamente, a diferencia de MPeSe con un log P de 2.43, indicando una menor polaridad y por lo tanto es una evidencia adicional para descartar que el metabolito encontrado en este trabajo sea un selenoacetaldehído. Los valores m/z de los metabolitos identificados en nuestro trabajo, así como sus respectivos valores log P y tiempos de retención se presentan en la Tabla 4.4, en donde se muestra una clara tendencia en cuanto al orden creciente del tiempo de retención comparado con la disminución de la polaridad (mayores valores log P) para cada metabolito.

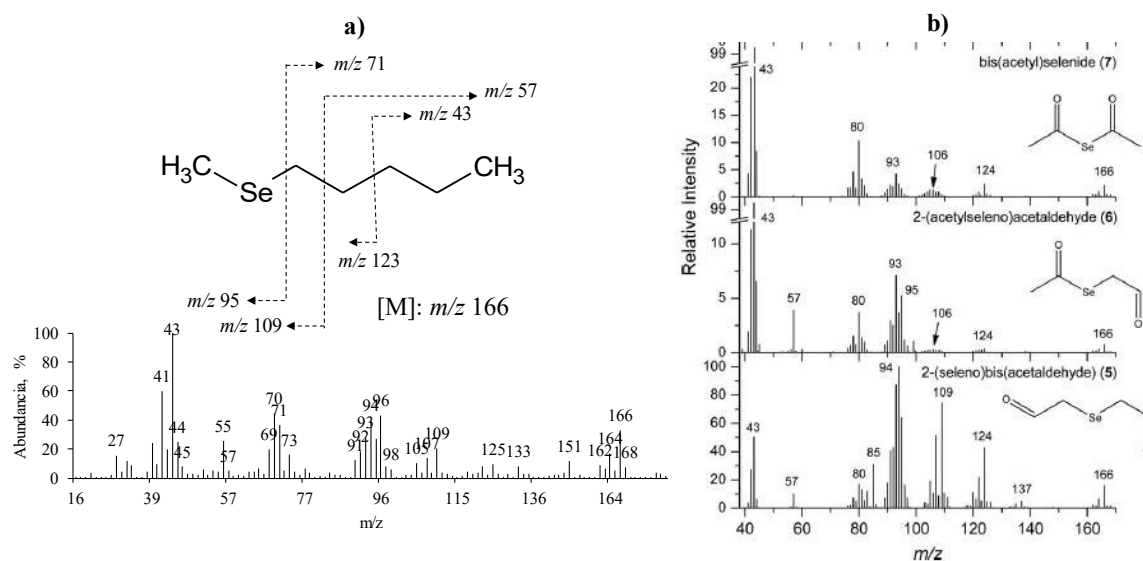


Fig. 4. 6: a) Espectro de masas y fragmentación propuesta para el metabolito metil-pentil selenio (TR: 8.5 min). b) Espectros de selenoacetaldehídos con un ion molecular m/z 166 obtenidos por Matich et al en plantas *N. tabacum* expuestas a Se [312].

En el caso del pico $[M]^+$ m/z 169.9 en el tiempo de retención 8.9 min, la masa coincide con la fórmula molecular $C_4H_{10}SSe$. Como se muestra en la Fig. 4.7, los iones m/z 167.9, 127.9 y 92.9 presentan el patrón isotópico característico de Se. En la fragmentación propuesta en esta figura el ion m/z 43 corresponde a un grupo propilo $[CH_3CH_2CH_2]^+$, los iones m/z 91, 93 y 95 corresponden a selenio metilado, y como se mencionó anteriormente, el fragmento de selenio metilado más estable corresponde a la especie $[HC\equiv Se]^+$. El fragmento m/z 111.8 se asignó al centro de la estructura que corresponde a $[SeS]^+$; el ion m/z 127.9 fue asignado a la pérdida del grupo propilo del extremo de la molécula, que corresponde a la especie $[HSeSCH_3]^+$, con sus respectivos iones correspondientes a los isótopos de Se (Fig. 4.7).

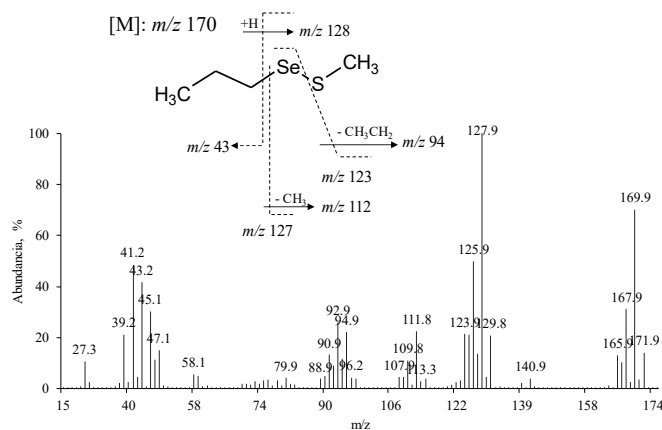


Fig. 4. 7: Espectro de masas adquirido en el tiempo de retención 8.9 min y fragmentación propuesta para la molécula de PrSeSM.

Hasta donde sabemos, el metabolito propilselenosulfenilmetilo (PrSeSM) había sido reportado únicamente en la especie *Allium fistulosum* en un experimento realizado en macetas en invernadero, y utilizando SPME(CAR/PDMS) en el HS de hojas secas homogenizadas y analizadas mediante GC-Q-TOF-MS [303], a diferencia de nuestro experimento realizado en *Allium cepa* L. crecidas en hidroponia, realizando HS-SPME *in vivo*, y utilizando GC-EI-MS.

Tabla 4. 4: Metabolitos volátiles de Se identificados en muestras de cebollas expuestas a Se(IV).

Metabolito	TR (min)	log P	[M] ⁺	Fórmula molecular
DMS _{Se}	2.4	0.3	110	C ₂ H ₆ Se
MeAlilSe	5.1	0.98	136	C ₄ H ₈ Se
MSeSM	5.5	2.15	142	C ₂ H ₆ SSe
DMDSe	6.8	2.40	190	C ₂ H ₆ Se ₂
MPentSe	8.5	2.43	166	C ₆ H ₁₄ Se
PrSeSM	8.9	3.21	170	C ₄ H ₁₀ SSe

Como se observa en la Tabla 4.4, dos de los metabolitos identificados son selenosulfenatos y es hasta donde sabemos, la primera vez que se identifican estos compuestos en la especie *Allium cepa* L. La formación de este tipo de compuestos se ha documentado con anterioridad pero ha sido en el caso de extractos de algas haptófitas (*Isochrysis galbana*), en el cual se identificó MSeSM [313]; en otro estudio se detectó la especie MSSeSM mediante HS-SPME en medios de cultivo *E. coli* en medio LB enriquecido con Se [307]; el metabolito MSeSM fue identificado mediante HS-SPME-GC-MS en plantas *Brassica juncea* expuestas tanto a Se(IV), Se(VI), Se-Met o KSeCN, y posteriormente, en una mezcla de estándares de DES y DESe se identificó el compuesto ESeSE, y se propuso que las reacciones de entrecruzamiento entre este tipo de análogos de compuestos de Se y S producen los compuestos selenosulfenatos [304]. Este es el primer reporte hasta donde sabemos que se reportan estos compuestos selenosulfenatos específicamente en *Allium cepa* L. y debido a la identificación de compuestos como dipropildisulfuro (DPDS) y DMS tanto en los grupos de cebollas no-expuestas como expuestas a Se(IV) (Fig. 4.1), y a la presencia de DMS_{Se} y DMDSe (Fig. 4.2) en las cebollas expuestas, se propone que existe una interacción entre estos metabolitos volátiles en el headspace,

que podría explicar la presencia de los dos compuestos selenosulfenatos en el grupo de cebollas expuestas a Se(IV).

6.1.2.3. Conclusiones

El análisis de metabolitos volátiles utilizando extracción por SPME con fibras del tipo DVB/PDMS en plantas de cebollas mediante GC-MS, reveló la disminución de abundancia de distintos metabolitos dialquilados de azufre en el grupo expuesto en comparación con el grupo control no-expuesto a Se(IV); además, se observó la formación de seis especies volátiles de Se en el grupo expuesto.

Se llevó a cabo la identificación de compuestos de azufre utilizando el ion m/z 45, que corresponde al fragmento más estable de azufre metilado $[\text{CH}\equiv\text{S}]^+$, y con esto se lograron encontrar señales correspondientes a metabolitos dialquilados de azufre. Los compuestos con mayor abundancia en el grupo control en comparación con el grupo expuesto fueron dipropiltrisulfuro, 3,5-dietil-1,2,4-tritriolano, propilmercaptano, metil-2-propenil disulfuro, dimetildisulfuro, metil-2-propenil disulfuro, 2,2-bis(metil)propano y metilpropil disulfuro, los cuales presentaron una razón de cambio > 2 . La disminución de estos compuestos en las muestras expuestas a Se sugiere el aumento en la actividad de enzimas encargadas de atenuar los efectos del estrés producidos por el Se. La analogía entre el azufre y el Se provoca que muchas de las enzimas involucradas puedan tomar como sustratos tanto S-compuestos como Se-compuestos, aumentando la producción de metabolitos producto de la detoxificación de Se, en vez de los compuestos dialquilados de azufre, como es el caso particular de los compuestos alifáticos de sulfuro.

Los compuestos volátiles de Se que se identificaron luego de exponer las plantas de *Allium cepa* L. a Se(IV) fueron, dimetilselenio, dimetildiselenio, propil selenosulfenilmetilo, metilalil selenio y dimetilselenosulfuro. Es notable la presencia de dos metabolitos selenosulfenatos, de los cuales el propil selenofulfenilmetilo se había reportado en hojas de *Allium fistulosum*, mientras que el dimetil selenosulfuro se ha reportado en plantas *Brassica juncea*, y en algas *Isochrysis galbana*, por lo que es importante el estudio de estos metabolitos en otro tipo de cultivos para establecer su función biológica en plantas estresadas con Se. En estudios anteriores, se ha reportado la interacción entre metabolitos alquilados de azufre con metabolitos alquilados de Se en la fase gaseosa, produciendo la formación de compuestos selenosulfenatos. En este trabajo, la presencia de DPDS, DMS, DMSe y DMDSSe podría explicar la formación de PrSeSM y de MSeSM en el headspace de cultivos expuestos a Se. Otro metabolito importante que hasta donde sabemos no había sido reportado con anterioridad en plantas *Allium cepa* L. es el alil metil selenio, el cual sería un claro ejemplo de la alteración de la ruta metabólica de la aliinasa, la cual metaboliza los S-alque(en)il-cisteína sulfóxidos, los cuales posteriormente son los responsables de la producción de metabolitos dialquilados, y particularmente la parte alil de este tipo de moléculas es frecuente en especies características de las plantas del género *Allium*.

Es importante resaltar la utilidad de la extracción de compuestos volátiles en productos alimenticios como la cebolla mediante SPME en headspace y su posterior identificación mediante GC-MS, pues se logró la identificación de un gran número de compuestos de azufre y Se utilizando la base de datos NIST. Otra ventaja importante es su utilidad en plantas de manera *in vivo*, lo cual reduce drásticamente algunos artefactos analíticos como lo son la descomposición u oxidación de los metabolitos analizados

6.1.3. Análisis de metabolitos en extractos de raíces, utilizando derivatización con ECF y GC-TQMS

6.1.3.1. Materiales y métodos

6.1.3.1.1. Crecimiento de raíces y extracción de metabolitos

En esta parte del trabajo, se analizaron los metabolitos presentes en raíces de cebollas en grupos no-expuestos y expuestos a Se(IV) (5 y 25 mgSe L⁻¹). Para esto, se realizaron duplicados para los tres grupos de experimentos en los que tres bulbos de cebolla fueron colocados en recipientes de plástico (8 cm de diámetro, 7 cm de altura) y se agregaron 100 mL de medio Hoagland con la misma composición descrita en la sección 6.1.2.1.2, durante 10 días. Después de este tiempo se agregaron 0, 5 o 25 mgSe L⁻¹ al medio Hoagland utilizando selenito de sodio pentahidratado como fuente de Se(IV), y la exposición bajo estas condiciones tuvo un periodo de 10 días.

Posterior al tiempo de exposición con Se, se lavaron las raíces de las cebollas con CaCl₂ 50 mM y con agua desionizada. Se cortaron las raíces y se homogenizaron con nitrógeno líquido, vertiéndose inmediatamente 650 mg de raíces homogenizadas por duplicado en 1 mL de etanol frío en tubos eppendorf de 2 mL, se agitaron en vórtex durante 60 s para la extracción de metabolitos y se centrifugaron 15 min a 12 000 g. Se utilizaron 300 µL del sobrenadante y para la eliminación de metabolitos hidrofóbicos se agregaron 200 µL de agua y 200 µL de cloroformo, se agitaron 60 s en vórtex y se centrifugaron 5 min a 10 000 g. Se recuperó la fase acuosa para el análisis posterior.

6.1.3.1.2. Derivatización con etil cloroformato

Se tomó un volumen de 400 µL del extracto y se le agregaron 200 µL de etanol, 150 µL de piridina y 200 µL de NaHCO₃ 150 mM. A esta mezcla se agregaron 50 µL de etilcloroformato y se agitó hasta la liberación de dióxido de carbono. Se agregaron nuevamente 200 µL de NaHCO₃ 150 mM y 50 µL de etilcloroformato, agitándose nuevamente hasta la liberación de dióxido de carbono.

Los analitos derivatizados fueron extraídos utilizando 200 µL de cloroformo, y se evaporó a temperatura ambiente para su posterior análisis. De manera paralela se derivatizó una muestra de estándares de aminoácidos Sigma AA18 (L-alanina, L-arginina, ácido L-aspártico, L-cistina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina, L-valina; 2.5 µmol mL⁻¹ en HCl 0.1 M) diluidos a una concentración de 25 nmol mL⁻¹ de la misma forma en la que se describe para las muestras.

6.1.3.1.3. Análisis GC-MS

Una vez que los metabolitos fueron derivatizados y se extrajeron al cloroformo, fueron transferidos a viales de automuestreador. Se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas, con los parámetros que se muestran en la Tabla 4.5, inyectándose de manera automática duplicados de cada experimento en el equipo con una temperatura de inyección de 250 °C. Se utilizó un tiempo de retraso de 10 min para la adquisición de señales (time delay); es decir, posterior a la inyección, la adquisición de espectros de masas inició 10 minutos después, con la finalidad de evitar la saturación del detector por la elución del solvente utilizado (cloroformo). Lo anterior se ajustó debido a que, en experimentos anteriores, a las mismas condiciones instrumentales, se observó un pico ancho en el rango 7 – 9 min, correspondiente al cloroformo.

Tabla 4. 5: Parámetros utilizados para el análisis de metabolitos derivatizados con ECF mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-TQMS)

Parámetro	Valor
Temperatura del inyector	250 °C
Volumen de inyección	1 µL
Split	0.01 min Apagado 0.75 min 1:10
Flujo de gas acarreador (He)	1 mL min ⁻¹
Columna	BP-5 MS (30 m x 0.25 mm; 0.25 µm)
Horno de columna	0 - 2 min 40 °C 2 - 30 min 40 - 320 °C (10 °C min ⁻¹) 30 - 32.5 min 320 °C
Temperatura de línea de transferencia	250 °C
Temperatura de fuente de ionización	280 °C
Energía de Ionización electrónica	70 eV
Intervalo de masas	<i>m/z</i> 25 - 500

Los datos obtenidos fueron procesados mediante MS Data Review (Bruker) para analizar los cromatogramas de iones totales y de iones extraídos. Los cromatogramas fueron convertidos en formato mzxml y analizados mediante la plataforma XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>), utilizando la configuración predeterminada para GC-MS; puesto que en este caso no se trata de espectrometría de masas de alta resolución, el procesamiento fue utilizado únicamente para obtener las señales con mayor cambio de abundancia entre los grupos (expuesto a Se(IV) respecto al control no-expuesto). La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación de los espectros de masas con la base de datos NIST 2.0.

6.1.3.2. Resultados y discusión

Esta parte del trabajo fue enfocada en los aminoácidos, incluyendo aquellos que podrían tener Se en su estructura. En el análisis de estándares de aminoácidos derivatizados con ECF y etanol mediante GC-MS, se pudieron detectar y confirmar 16 compuestos, los cuales en orden de elución fueron alanina (Ala), glicina (Gly), valina (Val), leucina (Leu), serina (Ser), isoleucina (Ile), treonina (Thr), prolina (Pro), histidina (His), ácido aspártico (Asp), metionina (Met), ácido glutámico (Glu), lisina (Lys), tirosina (Tyr) y cistina (Cys)₂. En la Fig. 4.8 se muestra el TIC del análisis de una mezcla comercial de aminoácidos derivatizados, en donde se visualizan 12 de los aminoácidos detectados, aunque, una vez que se realizó la búsqueda del pico base reportado para aminoácidos derivatizados con ECF [314], se logró la correcta confirmación de los 16 aminoácidos mencionados con anterioridad. Dicha identificación se encuentra reportada ampliamente en la literatura para aminoácidos analizados mediante GC-EI-MS, y en la Tabla 4.6 se muestran los iones reportados utilizados, así como el tiempo de retención obtenido en nuestro experimento. De los aminoácidos contenidos en la mezcla de estándares Sigma AA18, el único que no fue detectado fue arginina, ya que como señala Namera et al [315] se requieren condiciones específicas de pH para la derivatización

de este aminoácido, y el grupo imino permanece intacto, lo cual produce una baja retención en las columnas utilizadas normalmente.

Tabla 4. 6: Tiempos de retención de aminoácidos derivatizados con ECF y pico base utilizado para la identificación en GC-MS.

Aminoácido	Tiempo de retención (min)	Pico base monoisotópico m/z [314]
Alanina	12.5	116
Glicina	12.7	102
Valina	14.2	144
Leucina	15.1	158
Serina	15.3	132
Isoleucina	15.3	158
Treonina	15.4	129
Prolina	15.6	142
Histidina	16.3	154
Ácido Aspártico	17.4	188
Metionina	18.2	175
Ácido Glutámico	18.7	202
Fenilalanina	19.5	176
Lisina	22.9	156
Tirosina	24.4	107
Cistina	27.3	188
MeSeCys	17.6	194
SeMet	19.0	128
(SeCys) ₂	20.6	268

Una vez analizada la mezcla comercial de aminoácidos (Sigma AAS18), se analizaron también los estándares de seleno-aminoácidos SeMet, MeSeCys y (SeCys)₂, los cuales fueron identificados siguiendo el mismo protocolo, con los tiempos de retención 19.0, 17.6 y 20.6 min, respectivamente. Los espectros de masas presentaron el patrón isotópico típico de Se como se muestra en la Fig. 4.9, y en la Tabla 4.6 se anotaron los valores m/z monoisotópicos de sus picos base.

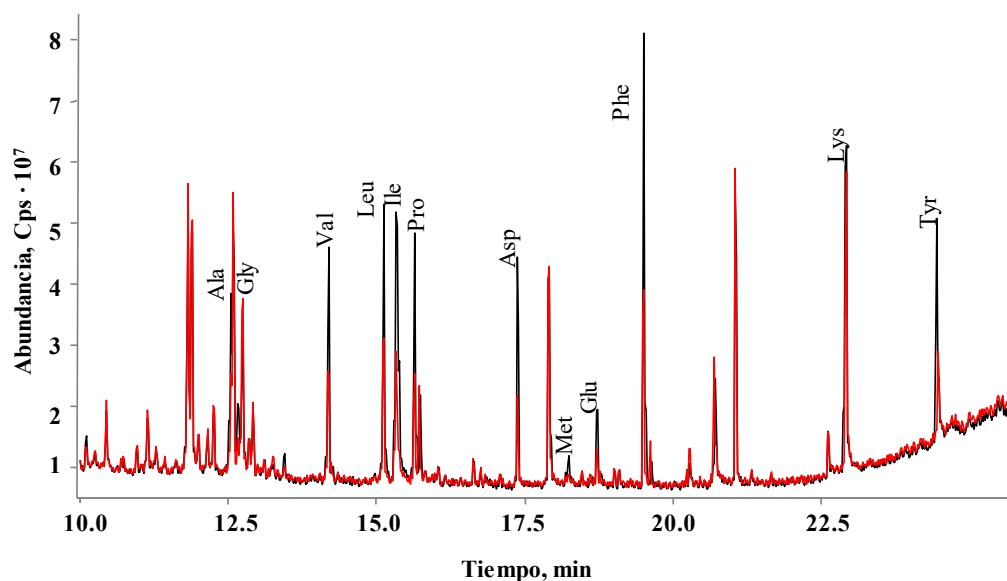


Fig. 4. 8: Cromatograma de iones totales de una muestra de aminoácidos derivatizados con ECF y etanol mediante GC-MS. Negro- aminoácidos a una concentración de 25 nmol mL⁻¹, Rojo- aminoácidos a una concentración de 10 nmol mL⁻¹.

Los datos de GC-MS adquiridos para extractos de cebollas expuestas, y controles no-expuestos a Se(IV) fueron analizados mediante la plataforma XCMS; se compararon los dos grupos con la prueba de Welch, aplicando los criterios de razón de cambio > 3 a un valor de significancia $p < 0.05$. Como resultado, se encontraron varios iones con mayor abundancia en el grupo expuesto a Se(IV) con respecto al grupo control no-expuesto. En la Tabla 4.7 se muestran los metabolitos de mayor abundancia en las cebollas expuestas a Se(IV), identificados mediante la biblioteca de NIST, en donde los principales metabolitos con un mayor cambio de abundancia en los grupos expuestos a Se con respecto al grupo control, fueron MeSeCys, MeCys y Met.

A diferencia de otros trabajos, en donde se reporta que el principal metabolito producido en cebollas expuestas a Se(IV) corresponde a Se-Met, en el presente trabajo no se identificó este metabolito en ninguna de las muestras. Los metabolitos encontrados principalmente en las cebollas expuestas fueron Se-metilselenocisteína (MeSeCys) y su análogo de azufre S-metilcisteína (MeCys). El aumento proporcional de estos dos metabolitos en raíces, con respecto a la creciente concentración de Se(IV) en el medio debe ser resaltado. Este hecho, puede sugerir una estrecha relación de ambos metabolitos en las rutas de metabolización de Se en cebollas, y debe ser estudiada más a fondo. Para este fin, en la Sección 7 se discuten las reacciones que se emplearon para elucidar esta parte del metabolismo en la captación/metabolización de Se en plantas. Es importante mencionar que, los resultados del aumento de Met en el grupo expuesto, se observó solamente en un experimento, mientras que en otras réplicas la abundancia de Met en los tres grupos analizados (no-expuesto y grupos expuestos) no se vio estadísticamente alterada. Por otro lado, y más importante, los demás metabolitos se repitieron en distintos experimentos realizados con las mismas condiciones instrumentales y experimentales.

Cabe señalar que los metabolitos derivatizados con ECF pueden ser analizados mediante cromatografía de líquidos. Algunas ventajas al realizar el análisis de esta forma es poder utilizar tipos

de ionización más suaves, particularmente ESI, y analizadores de masas de alta resolución, lo cual agrega las ventajas de tener la masa exacta de los derivatizados, patrón de fragmentación y patrón isotópico.

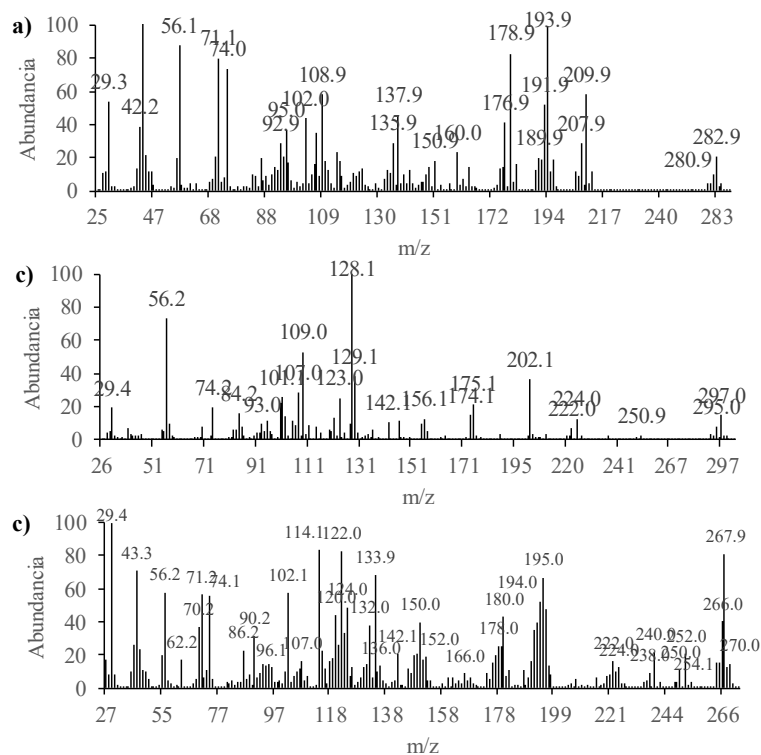


Fig. 4. 9: Espectros de masas obtenidos en GC-MS para estándares derivatizados con ECF y etanol de a) MeSeCys b) Se-Met y c) (Se-Cys)₂.

Tabla 4. 7: Lista de metabolitos derivatizados con ECF de mayor abundancia en comparación con los grupos de cebolla control no-expuesto y expuestos a Se(IV), detectados mediante prueba t e identificados con ayuda de NIST 2.0 en GC-MS.

Metabolito	Razón de cambio	Valor-p	Regulación	TR (min)	Pico principal
Se-metil-selenocisteína	41.4 ^a , 337 ^b	0.0003	S	17.6	m/z 194
S-metil cisteína	2.9 ^a , 7.8 ^b	0.0222	S	16.9	m/z 146
Metionina	16.1 ^a , 50.0 ^b	0.0007	S	17.3	m/z 129
Tirosina	1.5 ^a , 2.9 ^b	0.0474	Sub	24.4	m/z 107
Lisina	1.6 ^a , 2.5 ^b	0.0330	Sub	22.9	m/z 156

^aRazón de cambio calculada entre el grupo control no-expuesto y el grupo expuesto a 5 mgSe L⁻¹. ^bRazón de cambio calculada entre el grupo control no-expuesto y el grupo expuesto a 25 mgSe L⁻¹. S-metabolitos con

mayor abundancia en el grupo expuesto comparado con el grupo control no-expuesto. Sub-metabolitos con mayor abundancia en el grupo control no-expuesto comparado con los grupos expuestos a Se(IV).

6.1.3.3. Conclusiones

Se logró la separación y confirmación de 16 aminoácidos en la mezcla comercial de estándares, y de tres Se-aminoácidos (SeMet, MeSeCys y (SeCys)₂) a concentraciones de al menos 10 nmol mL⁻¹. Se obtuvieron los espectros de masas para cada estándar de aminoácido derivatizado y se comparó con la base de datos NIST para lograr la identificación. Además, se obtuvieron los picos principales para cada aminoácido derivatizado, con lo cual en un futuro esta técnica podrá utilizarse en la cuantificación de aminoácidos, teniendo la posibilidad de incorporar MRM en el proceso.

En el caso de los metabolitos extraídos en raíces de cebollas expuestas y no expuestas a Se(IV), se observaron cambios importantes de abundancia entre ambos grupos analizados, siendo los metabolitos de más relevancia para las raíces expuestas, MeSeCys y MeCys, los cuales se comprobó que aumentan proporcionalmente al aumento de la concentración de Se en el medio de cultivo. Es por eso que se plantea que ambos metabolitos provienen de rutas metabólicas similares o incluso de las mismas y por ello se analizaron diversas propuestas del metabolismo de estos compuestos. Es importante mencionar que los metabolitos derivatizados pueden ser analizados también mediante técnicas de cromatografía de líquidos, pudiendo incorporar ionización suave y espectrometría de masas de alta resolución, debido a esto en el capítulo 7 se presentan los resultados de las mismas muestras derivatizadas con ECF analizándolas mediante capHPLC-ESI-Q-TOF-MS.

6.2. Análisis metabolómico de extractos de raíces de cebolla expuestas y no-expuestas a Se(IV) analizadas mediante capHPLC-ESI-Q-TOF-MS

Esta parte del trabajo es una extensión del análisis de metabolitos de cebollas después de su derivatización con ECF, empleando otro sistema instrumental. Particularmente, las muestras fueron analizadas por cromatografía de líquidos en escala capilar y espectrometría de masas de alta resolución con ionización ESI. Además, se utilizó la plataforma XCMS para llevar a cabo el procesamiento de datos y análisis estadísticos.

6.2.1. Materiales y métodos

6.2.1.1. Instrumentación

Se utilizó un cromatógrafo modelo Ultimate 3000 RLSCnano system (Dionex Thermo Scientific) equipado con una bomba binaria, un termostato en el compartimento de la columna y un automuestreador, el cual fue acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución con sistema de ionización por electro-nebulización y analizador de masas cuadrupolo - tiempo de vuelo ESI-Q-TOF-MS modelo maXis Impact (Bruker Daltonics). Al realizar este acoplamiento (capHPLC-ESI-Q-TOF-MS) se utilizó el programa Hystar 3.2 LC-MS (Bruker Daltonics), el cual permite operar un sistema cromatográfico. Se utilizó una trampa capilar (Agilent 5 x 0.3 mm, C18, 5 µm) y una columna cromatográfica capilar de fase inversa Agilent 300 Extend-C18 (0.3 x 150 mm, 3.5 µm) con conexiones capilares nanoViper (d.i. 50 µm). El procesamiento de datos se realizó mediante el programa DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics). Los datos generados del análisis fueron analizados en la plataforma informática XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>), la cual permite el análisis de

datos metabolómicos (no dirigidos), para su análisis estadístico y con la comparación de bases de datos de Metlin para la factibilidad de la identificación de compuestos relevantes.

6.2.1.2. Muestras, derivatización con etil cloroformato y análisis capHPLC-Q-TOF-MS

Se analizaron extractos de cebollas preparadas como se describe en la sección 6.1.3.1.1. El procedimiento de derivatización con etilcloroformato se describe en la sección 6.1.3.1.2. Posterior a la derivatización y extracción con CHCl_3 se evaporaron las muestras a temperatura ambiente, se agregaron 60 μL de acetonitrilo y ácido fórmico y se diluyeron hasta obtener una concentración de acetonitrilo 20 % y ácido fórmico 0.1 %.

De las alícuotas procesadas, se inyectaron 10 μL (automuestreador mantenido a una temperatura de 10 °C) por duplicado de cada muestra en el sistema capHPLC-ESI-Q-TOF-MS. Las dos fases móviles fueron: (A) 0.1 % de ácido fórmico acuoso y (B) ácido fórmico 0.1 % en acetonitrilo. La muestra fue introducida a una trampa capilar C18, utilizando un flujo de 15 $\mu\text{L min}^{-1}$ con 10 % B; en esta etapa, se removieron compuestos iónicos y polares, reteniendo los metabolitos de interés en la trampa. Posterior a 2 min de estas condiciones, se procedió a eluir los compuestos preconcentrados en la trampa e introducirlos a la columna capilar Agilent 300 Extend-C18 mantenida a 40 °C, llevando a cabo la separación a un flujo de 4 $\mu\text{L min}^{-1}$ con el programa de elución mostrado en la Tabla 4.8. La salida de la columna fue conectada a la fuente de ionización ESI, operada en modo positivo.

Tabla 4. 8: Parámetros utilizados para el análisis de extractos de raíces expuestas y no-expuestas a Se(IV) derivatizadas con ECF, mediante cromatografía de líquidos en escala capilar y espectrometría de masas de alta resolución (capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS)

Parámetros de HPLC	Valor
Columna	Agilent 300 Extend-C18 (0.3 x 150 mm, 3.5 μm)
Programa de elución	Tiempo (min)
	(B) CHO_2H 0.1 % en ACN
	0-2
	32
	37
	40
Temperatura	40 °C
Flujo	4 $\mu\text{L min}^{-1}$
Volumen inyectado	10 μL
Parámetros de ESI-Q-TOF-MS	Valor
Modo ESI	Positivo
Voltaje de ionización	4 500 V
Flujo de gas de secado (N_2)	4.0 L min^{-1}
Temperatura de secado	180 °C
Presión de gas de nebulización	0.4 bar
Intervalo de masas adquirido	m/z 20 – 1250
Adquisición de MS/MS	Automático
Velocidad de adquisición MS/MS	2 Hz (Intensidad < 40 000)
	5 Hz (Intensidad > 40 000)
Calibración de masa fija	Estearato de metilo (299, 2945 m/z)

Los resultados obtenidos fueron procesados utilizando Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics), realizando la recalibración de la masa exacta, y la sustracción de fondo, además de su conversión en formato .mzxml. El procesamiento posterior de datos fue realizado en la plataforma XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>), en el cual se creó la tarea de comparación por pares (pairwise job) para los cromatogramas obtenidos de cebollas no-expuestas y expuestas a Se(IV), respectivamente. Para definir los picos cromatográficos (peak picking), se utilizó el algoritmo CentWave con los siguientes parámetros: máxima tolerancia de m/z 10 ppm, anchura de picos cromatográficos 5 - 60 s, valor mínimo de señal/ruido 6. Los cromatogramas se alinearon para igualar tiempos de retención de los picos correspondientes a los mismos compuestos, utilizando los siguientes criterios de agrupación: anchura de m/z 0.015; mínima fracción de muestras en cada uno de los grupos 0.5; anchura de banda (desviación del tiempo de retención aceptable) 5 s. Este procesamiento generó una lista de características moleculares que incluyen para cada una de ellas su tiempo de retención, los valores de m/z asociados y sus abundancias. Para la evaluación comparativa entre dos grupos, se utilizó la prueba estadística t de varianzas desiguales (test Welch), estableciendo un valor de significancia estadística $p < 0.05$ en la detección de características moleculares; el valor 2 como un mínimo de razón de cambio (cambio de abundancia de dichas características entre grupos) con nivel de significancia $p < 0.05$.

Para la identificación de compuestos se definió una lista de aductos en el análisis en XCMS, puesto que el análisis se realizó en muestras derivatizadas con etilcloroformato y etanol, se definió la contribución de masa exacta que representa dicha modificación en las estructuras con “n” número de grupos amino y/o carboxilo y del ion molecular protonado que se espera debido al tipo de ionización utilizada (ESI +), como se muestra en la Tabla 4.9.

Tabla 4. 9: Aductos definidos para la identificación de compuestos en XCMS, utilizando la diferencia de masa por la contribución de la derivatización con ECF y etanol.

Aducto	Número de grupos carboxilo	Número de grupos amino	Diferencia de masa
[M+ECF+H] ⁺ , 1C	1	0	29.0391
[M+ECF+H] ⁺ , 2C	2	0	57.0704
[M+ECF+H] ⁺ , 3C	3	0	85.1017
[M+ECF+H] ⁺ , 1N	0	1	73.0290
[M+ECF+H] ⁺ , 1C, 1N	1	1	101.0603
[M+ECF+H] ⁺ , 2C, 1N	2	1	129.0916
[M+ECF+H] ⁺ , 3C, 1N	3	1	157.1229
[M+ECF+H] ⁺ , 2N	0	2	145.0501
[M+ECF+H] ⁺ , 1C, 2N	1	2	173.0814
[M+ECF+H] ⁺ , 2C, 2N	2	2	201.1127
[M+ECF+H] ⁺ , 3N	0	3	217.0712
[M+ECF+H] ⁺ , 1C, 3N	1	3	245.1025

La identificación de los metabolitos (en su mayoría aminoácidos) se realizó con la búsqueda de la masa molecular que resulta de restar a la masa exacta obtenida para cada metabolito derivatizado, la contribución de masa por la derivatización de un grupo carboxilo y un grupo amino (1C, 1N), aunque, debido a la posible presencia de aminoácidos básicos y ácidos, o metabolitos con una diferente

proporción de grupos carboxilo/amino, se agregaron combinaciones en cuanto a las cantidades de grupos amino y carboxilo. Con la inclusión de esta lista de aductos, la búsqueda de los compuestos se realizó con respecto a la masa exacta del compuesto sin derivatizar (debido a que se resta la m/z del metabolito derivatizado menos el aducto definido) y con base en sus fragmentos MS/MS en la base de datos “Metlin”, una base de datos incluida para la predicción de estructuras en la plataforma XCMS a partir de los datos MS y MS/MS. A la fecha, Metlin contiene información de aproximadamente 962 000 moléculas, incluyendo lípidos, esteroides, metabolitos de plantas y bacterias, péptidos pequeños, carbohidratos, metabolitos/ fármacos exógenos y agentes tóxicos. Metlin además utiliza las estructuras conocidas de metabolitos, su composición elemental, y la medición de masa exacta de los fragmentos para predecir la estructura de los fragmentos; también incluye información de metabolitos como lo son el nombre, estructura, fórmula elemental, masa, y las claves específicas de identificación de compuestos (ID) de varias bases de datos como “KEGG”, “HMDB” y “PubChem”. De todas las moléculas propuestas como resultado del procesamiento de datos, se consideraron aquellas con el menor error de masa, el cual es proporcionado por Metlin en partes por millón (ppm).

6.2.2. Resultados y discusión

En el análisis de estándares de aminoácidos derivatizados con ECF y etanol, se separaron e identificaron 13 aminoácidos, los cuales en orden de elución fueron serina (Ser), glicina (Gly), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), tirosina (Tyr), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), lisina (Lys), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe) y cistina (Cys)₂. Al igual que en el análisis por GC-MS, la Arg no fue detectada con las condiciones utilizadas. Aunado a ello, no se pudo diferenciar entre Leu e Ile debido a su co-elución y a la misma masa exacta de ambos; en el caso del Glu, la intensidad de su señal fue insuficiente para obtener su espectro MS/MS. Para el resto de los aminoácidos, el error de masa exacta fue < 5 ppm; además, se utilizaron los fragmentos obtenidos mediante MS/MS de los iones moleculares para realizar la identificación mediante MetFrag, utilizando un error máximo de 5 ppm y seleccionando la base de datos KEGG. El resumen de los parámetros utilizados para la confirmación de los estándares de aminoácidos derivatizados con ECF y analizados mediante capHPLC-ESI-Q-TOF-MS se muestra en la Tabla 4.10.

Los cromatogramas obtenidos de las muestras de cebollas del grupo control no-expuesto y de los grupos expuestos a Se analizadas mediante capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS muestran diferencias que pueden notarse visualmente (Fig. 4.10). Los cromatogramas de las muestras fueron procesados con ayuda del software Data Analysis, llevando a cabo la recalibración y sustracción del ruido. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando la plataforma XCMS. Con base en los resultados de la prueba t, en la que se compararon los datos de extractos de cebolla derivatizados con ECF, se aplicaron los criterios de razón de cambio > 2 a un valor de significancia $p < 0.05$, encontrándose varios iones con mayor abundancia en el grupo expuesto a 25 mgSe L^{-1} . En dicha evaluación se generó una gráfica de nubes, en la cual se muestra el conjunto de cromatogramas para cada grupo (en este caso expuestas y no-expuestas) divididos simétricamente en el eje Y, el cual representa los valores m/z de los iones encontrados. De esta manera, en la parte superior se encuentra el conjunto de cromatogramas pertenecientes a muestras expuestas y en el lado opuesto, los cromatogramas del grupo control no-expuesto. Sobre cada conjunto de cromatogramas se incluyen círculos, los cuales representan las características moleculares; la posición de cada círculo respecto al eje X corresponde a su respectivo tiempo de retención mientras que el valor en el eje Y indica el valor m/z del ion extraído en ese

segmento del cromatograma. Por su parte, el tamaño y color de los círculos son asignados en función del parámetro estadístico p (que representa el cambio significativo estadístico entre ambos grupos) y el cambio que presenta esta característica entre dos grupos bajo cierto criterio de significancia estadística (razón de cambio). En concreto, los parámetros incluidos en cada nube son: el tiempo de retención y la m/z pertenecientes a una característica molecular dada, la razón de cambio de su abundancia entre dos grupos (razón de cambio) y el valor p de significancia estadística correspondiente. En la Fig. 4.11 se muestra la gráfica de nubes del análisis.

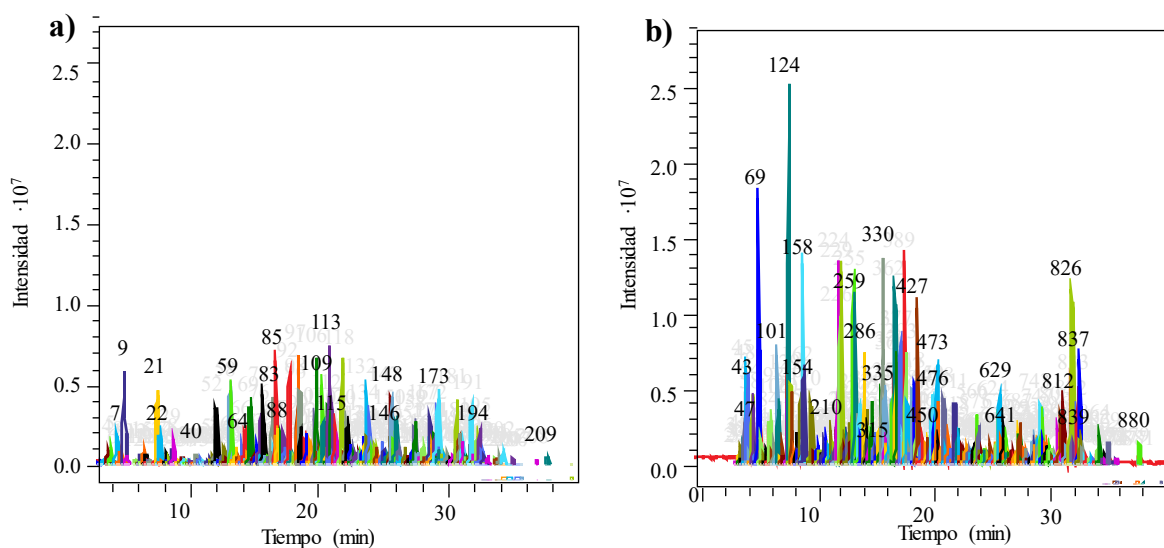


Fig. 4. 10: Cromatogramas deconvolucionados obtenidos en capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS para una muestra de cebollas a) no expuesta y una de b) cebollas expuestas a 25 mgSe L^{-1} , elegidas aleatoriamente.

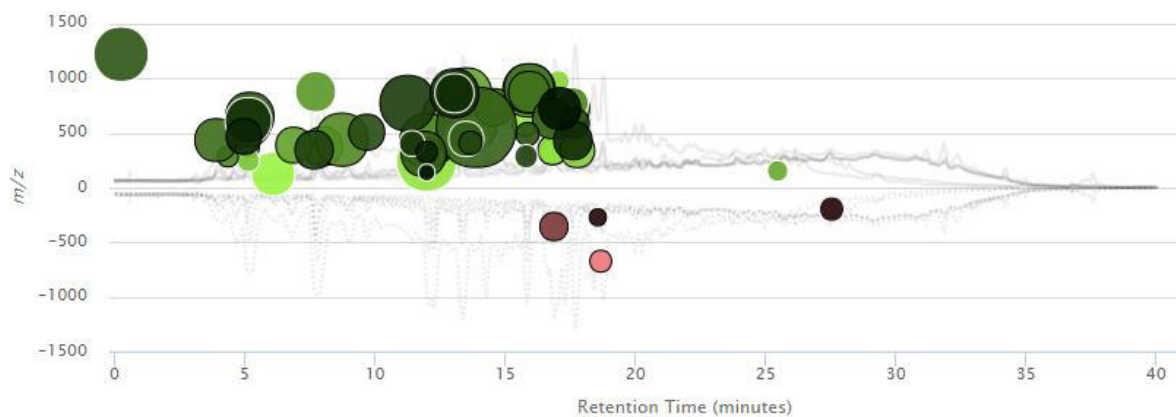


Fig. 4. 11: Gráfico de nubes obtenido en la comparación de los cromatogramas de dos grupos de muestras: cebollas no-expuestas y cebollas expuestas a Se(IV) (25 mgSeL^{-1}), realizado mediante la plataforma XCMS para visualizar iones con cambios de abundancia entre grupos con una razón de cambio >2 a nivel estadístico $p < 0.05$.

Tabla 4. 10: Estándares de aminoácidos derivatizados con ECF y su identificación en capHPLC-ESI-Q-TOF-MS

Aminoácidos (N-etoxicarbonil-etil ésteres)	T ret (min)	[M+ECF+H] ⁺ <i>m/z</i>	Error de masa (ppm)	MS/MS	
				Fragmentos (<i>m/z</i>)	Abundancia (%)
L-Serina	5.5	<i>m/z</i> 206.1025	0.97	132.0662	100
				86.0246	61.4
				60.0621	44.1
Glicina	6.7	<i>m/z</i> 176.0919	1.13	174.9732	100
				102.0558	71.0
				156.9605	32.6
L-Treonina	6.9	<i>m/z</i> 220.1182	1.36	100.0398	100
				146.0810	27.7
				128.0346	22.0
L-Alanina	8.9	<i>m/z</i> 190.1077	1.58	116.0712	100
L-Prolina	12.0	<i>m/z</i> 216.1239	4.16	142.0865	100
				174.9743	30.0
				98.0965	17.2
L-Tirosina	12.1	<i>m/z</i> 282.1340	1.42	208.0963	100
				136.0756	79.0
				91.0546	54.1
Ácido L-Aspártico	12.3	<i>m/z</i> 262.1292 ^a	2.67	188.0916	100
				142.0498	73.3
				116.0705	69.2
Ácido L-Glutámico	13.3	<i>m/z</i> 276.1449 ^a	2.53	-	-
L-Lisina	13.4	<i>m/z</i> 319.1881 ^c	4.33	156.1033	100
				199.1087	12.9
				84.0817	11.3
L-Valina	14.3	<i>m/z</i> 218.1394	3.21	144.1024	100
				116.0710	65.6
				98.0603	26.1
L-Leucina; Isoleucina	17.1	<i>m/z</i> 232.1554	4.74	158.1179	100
				102.0553	49.4
				130.0865	40.7
L-Fenilalanina	17.3	<i>m/z</i> 266.1402	4.64	120.0811	100
				192.1026	95.4
				103.0547	57.3
L-Cistina	17.6	<i>m/z</i> 441.1385 ^b	4.67	220.0651	100
				278.0522	14.2

^aEl ion molecular mostrado corresponde a la contribución de la derivatización por 2 grupos carboxilo y 1 grupo amino. ^bEl ion molecular corresponde a la contribución de la derivatización por 2 grupos carboxilo y 2 grupos amino. ^cEl ion molecular corresponde a la contribución de la derivatización por 1 grupo carboxilo y 2 grupos amino.

Para la identificación de los metabolitos cuya abundancia era afectada por la exposición a Se(IV), la búsqueda realizada en XCMS fue conducida en la base de datos Metlin, y para esto se tomaron los valores de masa exacta de características moleculares del gráfico de nubes. Los valores utilizados en la búsqueda se obtuvieron sustrayendo la masa debida a la reacción de derivatización con ECF y a la protonación por ESI del valor m/z del ion encontrado (la lista de modificaciones se presenta en la Tabla 4.9).

Los resultados obtenidos en la identificación se resumen en la Tabla 4.11, donde se incluyen los metabolitos de mayor abundancia en el grupo de cebollas expuestas a Se(IV). Además del nombre del compuesto, en la tabla se muestran: tiempo de retención, masa exacta del ion, error de masa exacta, número de referencia del compuesto en Metlin y la razón de cambio entre muestras del grupo expuesto respecto al grupo control. Cabe mencionar que la identidad de los compuestos fue confirmada utilizando los espectros MS/MS en MetFrag; también se utilizó CFM-ID (<https://cfmid.wishartlab.com/predict>), un programa que genera espectros de MS de manera *in silico* con respecto a la estructura en lenguaje InChI. El único compuesto que no fue encontrado a través de Metlin fue el ácido 2-selanilidenacético (Tabla 4.11); en este caso, la identificación se logró con base en la masa exacta, patrón isotópico, y los fragmentos generados de MS/MS en la búsqueda de la base de datos PubChem (CID 19599051). En el caso del ácido 2-amino-2-sulfanilacético, existió la probabilidad de tratarse de dos isómeros estructurales, no obstante, con la búsqueda del espectro MS/MS en MetFrag y CFM-ID, el metabolito fue anotado con la estructura encontrada en Metlin id 771304 y PubChem CID 13764830.

Los metabolitos S-metil cisteína y homocisteína poseen el mismo valor de masa exacta, sin embargo, utilizando las herramientas antes mencionadas, MetFrag y CFM-ID, además de utilizar la diferencia en los tiempos de retención, se identificaron en los tiempos de retención 12.5 y 11.5 min, respectivamente. Se calculó el coeficiente de reparto octanol/H₂O que define la polaridad de un compuesto, utilizando el programa ChemSketch 1.1 para las estructuras con la modificación debida a la derivatización con ECF, resultando en valores log-P para la S-metil cisteína derivatizada y para la homocisteína derivatizada de 2.46 y 2.28, respectivamente. Lo anterior indica una mayor polaridad de la Hcy con respecto a la MeCys, aportando una evidencia complementaria que confirma la anotación de estos dos metabolitos.

Como era de esperarse, en concordancia con los resultados de GC-MS, se confirma la presencia de los metabolitos MeSeCys, MeCys y Met, con su mayor abundancia en las cebollas expuestas a Se(IV). El metabolito S-alilcisteína, un metabolito reportado anteriormente en distintos trabajos, aumenta significativamente en las cebollas expuestas. Todos estos metabolitos han sido descritos como compuestos benéficos, con propiedades anticarcinogénicas, lo cual reafirma la idea de producir cebollas para consumo humano Se-enriquecidas como una mejora en los alimentos. De nuevo, se repite la tendencia en el aumento de los análogos MeCys y MeSeCys, lo cual refuerza la evidencia de una estrecha relación metabólica de estos compuestos en las rutas de asimilación y/o detoxificación de Se.

Tabla 4. 11: Lista de metabolitos de mayor abundancia en las cebollas expuestas a Se(IV) (25 mgSe L⁻¹) respecto al grupo control no-expuesto.

Compuesto identificado	Fórmula iónica [M+ECF+H] ⁺ <i>m/z</i>	Razón de cambio	TR (min)	Error (ppm)	I.d. Metlin
Se-Metil Seleno Cisteína	[C ₉ H ₁₇ NO ₄ Se] ⁺ 284.0397	258	13.2	0.5	87701
Ácido 2-amino-2-sulfanilacético	[C ₇ H ₁₃ NO ₄ S] ⁺ 208.0639	94	6.2	0.5	771304
S-Metil Cisteína	[C ₉ H ₁₇ NO ₄ S] ⁺ 236.0957	53	12.1	2.5	6490
S-Alil Cisteína	[C ₁₁ H ₁₉ NO ₄ S] ⁺ 262.1113	44	9.8	2.1	71319
Homocisteína	[C ₉ H ₁₇ NO ₄ S] ⁺ 236.0960	38	11.5	3.8	302066
Ácido 2-Selanilideneacético	[C ₄ H ₆ O ₂ Se] ⁺ 166.9608 ^a	18	7.1	1.3	-
Metionina	[C ₁₀ H ₁₉ NO ₄ S] ⁺ 250.1110	10	13.7	1.0	728683
Alanina	[C ₈ H ₁₅ NO ₄] ⁺ 190.1076	9.0	8.9	1.1	636928
Valina	[C ₁₀ H ₁₉ NO ₄] ⁺ 218.1394	9.0	14.1	0.9	609835
Cistina	[C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₈ S ₂] ⁺ 441.1374 ^b	8.0	17.7	3.2	314946

Los superíndices en las fórmulas iónicas corresponden a los metabolitos derivatizados con una contribución de masa debida a: ^aUn grupo carboxilo. ^bDos grupos carboxilo y dos grupos amino. Todos los demás casos corresponden a metabolitos con un grupo carboxilo y un grupo amino.

Es importante remarcar la identificación de los compuestos ácido 2-amino-sulfanil acético (2ASA) y del ácido 2-selanilideneacético, puesto que, hasta donde sabemos, estos compuestos no han sido reportados en sistemas biológicos, y por su aumento de abundancia en las cebollas expuestas a Se(IV) es evidente que ambos participan en el metabolismo de Se en cebollas. Es importante remarcar además la similitud que existe entre el 2ASA con la Cys ya que ambos son aminoácidos y ambos presentan un grupo tiol en su estructura (Fig. 4.12). Debido a su clara analogía este aminoácido no-biogénico deberá ser analizado más a fondo para elucidar el papel biológico que tiene en la defensa que podría estar activándose en las plantas expuestas.

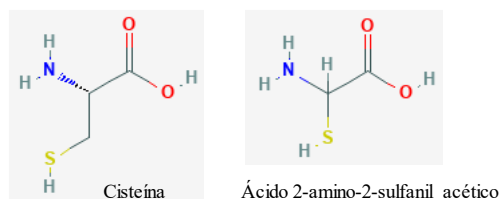


Fig. 4. 12: Estructura de cisteína y del ácido 2-amino-2-sulfanil acético.

Existe un claro aumento de S-aminoácidos en las cebollas expuestas a Se(IV), tal es el caso de S-MeCys, 2ASA, S-alilcisteína, homocisteína, metionina y cistina. Esto indica la activación de rutas metabólicas de asimilación comunes para el azufre y el Se, las cuales, además explican el aumento de posibles sustratos para la producción de los metabolitos identificados mediante SPME-GC-MS. Particularmente, se asume que S-alilcisteína estaría estrechamente relacionada con el metabolito volátil alilmetil disulfuro, mientras que la cisteína y metionina se han descrito como precursores de DMDS y DMS respectivamente, la homocisteína podría aportar el grupo propilo de algunas especies como DPTS, o incluso en la especie volátil propilselenosulfenil metilo (PrSeSM).

Dos de los aminoácidos identificados con mayor abundancia en el grupo de cebollas expuestas fueron alanina y valina, los cuales aumentan debido a que son posiblemente sustratos para la captación y asimilación de Se. En particular, en el siguiente capítulo se discute sobre los posibles sustratos que emplea la planta para producir los selenoaminoácidos, en el cual se tiene evidencia que alanina es un aminoácido importante en la síntesis de MeSeCys.

6.2.3. Conclusiones

El análisis mediante capHPLC-ESI-Q-TOF-MS de estándares de aminoácidos derivatizados con ECF, permitió su separación e identificación con base a su masa exacta, patrón isotópico, y espectros MS/MS, con lo que se comprobó la utilidad de esta técnica y se procedió a analizar muestras reales. La extracción y derivatización con ECF de metabolitos en raíces de cebolla reveló la importancia de diez compuestos que se encuentran en mayor proporción en el grupo expuesto a Se(IV) en comparación con el grupo control. Al igual que en el análisis GC-MS, se confirmó el aumento de MeCys además de la formación de MeSeCys en el grupo expuesto. También se identificó el metabolito ácido-2-selanilideneacético, del cual existe escasa información en la bibliografía, e incluso hasta donde sabemos es la primera vez que se identifica este compuesto en plantas de cebolla. El ácido 2-selanilideneacético podría ser un intermediario en la metilación y reducción de Se(IV) a través de la captación de plantas, y ser un sustrato para la síntesis de Se-aminoácidos como MeSeCys.

Seis de los compuestos identificados con un aumento en la razón de cambio > 2 en el grupo de cebollas expuestas con respecto a las no-expuestas son S-aminoácidos, los cuales son: S-metilcisteína, S-alilcisteína, ácido 2-amino-2-sulfanil acético (2ASA), metionina, homocisteína y cistina. 2ASA tiene una clara analogía con cisteína y homocisteína, y es necesario estudiarlo más a fondo para poder elucidar sus funciones biológicas y su papel en el estrés de plantas expuestas a Se.

Este estudio es importante debido a que gracias a su enfoque metabolómico no dirigido tiene un gran poder de identificar posibles compuestos que ayuden a ampliar el conocimiento en las rutas metabólicas involucradas para la captación de Se en plantas. Además, es vital este tipo de análisis en el área de alimentos, y en particular, en productos como la cebolla, los cuales al ser fortificados con

Se producen metabolitos de vital importancia para el desarrollo de alimentos de valor nutricional con propiedades anticarcinogénicas.

7. Experimentos *in vitro* enfocados en la síntesis de seleno-metil-Se-cisteína

En el capítulo anterior (Capítulo 6), se ha demostrado que las raíces de cebolla captan Se(IV) presente en la solución nutritiva, produciendo MeSeCys y MeCys de manera proporcional a la concentración de Se(IV) en el medio. Aunado a ello, se observó el aumento en la formación de varios compuestos volátiles de azufre, selenio o selenosulfenatos en las cebollas expuestas. También ocurrió un aumento de S-aminoácidos en las plantas expuestas, y todas estas evidencias confirman una estrecha relación entre las rutas de asimilación/metabolización de azufre y Se, reportada en diferentes estudios anteriores. En particular, nuestros resultados sugieren similitudes en la síntesis de MeSeCys y MeCys.

Con la finalidad de obtener evidencias más directas sobre las reacciones que ocurren en el metabolismo de Se, se llevaron a cabo experimentos *in vitro*, preparando mezclas de diferentes sustratos potenciales. Como fuente de selenio se utilizaron selenito de sodio (Se(IV)) y ácido metilselenínico (AMSe) agregando distintos aminoácidos y posibles donadores del grupo metilo. Las principales combinaciones analizadas fueron: Se(IV) o AMSe, con Ala, Cys, Met, Ac-Ser, extractos acuosos de cebolla (propuesto para que existiera la presencia de enzimas), piridoxal o fosfato de piridoxal (PLP). Las mezclas de reacción fueron analizadas mediante espectrometría de masas de alta resolución.

7.1. Objetivos

Avanzar en el entendimiento de la síntesis de MeSeCys en raíces de cebolla.

7.1.1. Objetivos específicos:

- Plantear distintas fuentes de aminoácidos que tengan una posible relevancia en la ruta de asimilación de Se en plantas, y mezclar con fuentes de Se como Se(IV) y AMSe para analizar los productos generados en las posibles reacciones.
- Utilizar ESI(+)-Q-TOF-MS para el análisis de las mezclas, aprovechando su alto poder de resolución para la identificación de los productos de las reacciones analizadas.
- Identificar los productos de las reacciones analizando su masa exacta, patrón isotópico y fragmentación del espectro MS/MS y proponer los mecanismos de reacción subyacentes.

7.2. Materiales y métodos

7.2.1. Reactivos e instrumentación

Se utilizaron los siguientes reactivos marca Sigma Aldrich: ácido metilselenínico (AMSe), selenito de sodio pentahidratado (Se(IV)), L-alanina (Ala), piridoxal-5-fosfato hidratado (PLP), L-cisteína (Cys), L-metionina (Met), S-adenosil-L-metionina (AdoMet), O-fosfo-L-serina (SEP), L-glutatión reducido (GSH).

Las mezclas de reacción fueron introducidas mediante infusión directa al sistema ESI(+)-Q-TOF-MS (modelo maxis impact, Bruker Daltonics). La identificación fue basada en la medición de la masa exacta, patrón isotópico característico de Se, espectros de fragmentación, así como en el uso de los estándares conocidos para los sustratos utilizados.

7.2.2. Composición de las soluciones *in vitro*

Las soluciones se prepararon con al menos dos de los siguientes tipos de reactivos: (i) sustrato que aporte la parte aminoacídica, (ii) sustrato que aporte Se a las estructuras, (iii) agente metilante o cofactor. En el caso de los sustratos de naturaleza de aminoácidos, se utilizaron: alanina, cisteína, glutatión, acetilserina, fosfoserina, o extractos acuosos de raíces de cebolla. En el caso de los sustratos que aportaran Se en las estructuras se utilizó selenito de sodio o ácido metilselenínico. Finalmente, para el caso de los agentes metilantes se utilizó S-adenosil-L-metionina, ácido fólico, piridoxal hidrocliclorado o piridoxal-5-fosfato (PLP).

Para cada estándar utilizado se realizó un stock de concentración adecuada (entre 1 000 – 10 000 mg mL⁻¹), de los cuales se tomaba un volumen adecuado y se vertía en tubos eppendorf de 2 mL. Las muestras se dejaron incubar durante aproximadamente 20 h, realizando experimentos a temperatura ambiente o a una temperatura de 60 °C. Posterior al tiempo de incubación, se tomaron volúmenes adecuados para ser diluidos 1 000 veces en acetonitrilo:ácido fórmico 0.1 % (1:1), y posteriormente se ingresaron en modo infusión a ESI(+)-Q-TOF-MS. Se adquirieron los espectros MS (intervalo *m/z* 70 - 800) además de los espectros auto MS/MS para poder elucidar la estructura de los compuestos producidos mediante estas reacciones. En este sentido, se realizó la adquisición de los estándares por separado, se identificaron sus respectivos fragmentos, y una vez que se analizaron las distintas mezclas se analizaron los fragmentos que no correspondieron a ninguna de las señales generadas en los espectros de los estándares aislados.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Mezclas de selenio, aminoácidos y cofactores

En primer lugar, se prepararon y analizaron diferentes mezclas con Se(IV), pero en ninguna de ellas se observó la formación de ningún compuesto nuevo que indicara la incorporación de Se en otras estructuras. Por otro lado, al utilizar ácido metilselenínico (AMSe) como fuente de selenio, los resultados del análisis por espectrometría de masas indicaron la formación de compuestos orgánicos de Se. Específicamente, se observó la incorporación de la parte metilada de Se (CH₃Se) en el grupo tiol de la cisteína y del glutatión, mientras que en el caso de otro tipo de aminoácidos se observó la incorporación de metilselenio en la posición del carbono β de aminoácidos en presencia de piridoxal o de PLP, como fue el caso de acetilserina, fosfoserina, y alanina.

En la Fig. 5.1 se presenta el metabolismo de Se en plantas, reproducido de la base de datos KEGG, donde se remarcan dos metabolitos encontrados en este trabajo MeSeCys y MeSeCysO. De acuerdo con este esquema, la primera etapa de asimilación del Se inorgánico es su reducción a H₂Se considerado un intermediario común de diferentes rutas posteriores. También es ampliamente aceptado que la síntesis de MeSeCys ocurre mediante la metilación directa de la SeCys con ayuda de la enzima selenocisteína metil transferasa y que el MeSeCysO es un producto de la oxidación de MeSeCys. Los resultados de este trabajo sugieren que podría existir una ruta alterna de la síntesis de MeSeCys, en la que el primer paso es la metilación del Se(IV) a AMSe y después, la formación de MeSeCysO y MeSeCys (marcado en rojo en la figura).

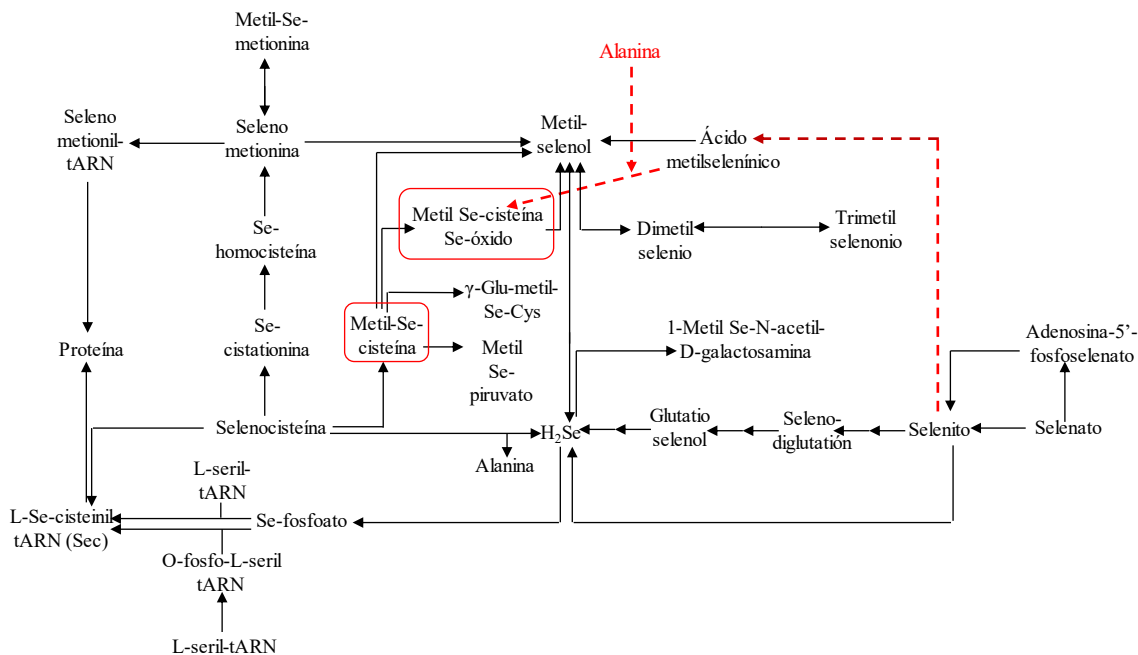


Fig. 5. 1: Metabolismo de Se reproducido de la base de datos KEGG, marcando los metabolitos de interés y la ruta alterna de la síntesis de MeSeCys propuesta en este trabajo.

Esta propuesta surgió con base al análisis de la mezcla de Ala, AMSe y PLP a una concentración de 2.2, 1.0 y 1.6 mmol L⁻¹ respectivamente (es decir 200 μ g mL⁻¹ cada uno), incubada 20 h a temperatura ambiente. Cabe señalar que, en el análisis de los estándares individuales, Ala produjo el ion [M+H]⁺ con una m/z 90.0550; para el AMSe se obtuvieron con el respectivo patrón isotópico típico de Se el ion [M+H]⁺ con m/z 128.9449, además del fragmento m/z 110.9344; en el caso del estándar de PLP se obtuvo el ion [M+H]⁺ m/z 248.0318, además de los fragmentos m/z 168.0655 y m/z 150.0555.

Por su parte, en el análisis de la mezcla de estos tres estándares, se identificó MeSeCysO como producto de reacción, tal como se representa en la Fig. 5.2. Específicamente se obtuvo el ion [M+H]⁺ m/z 199.9825, el cual corresponde a la molécula de MeSeCysO. El patrón isotópico experimental indica la presencia del Se (Fig. 5.2a), y está acorde con el patrón isotópico teórico de la fórmula molecular de la MeSeCysO (C₄H₉NO₃Se) (Fig. 5.2b) ($\Delta m/z = 2.5$ ppm; mSigma = 12.5). Además, con base en el espectro MS/MS, se explica la fragmentación de la molécula, confirmando su identidad (Fig. 5.2c). La identificación fue reforzada realizando una búsqueda con la masa exacta y los fragmentos del espectro MS/MS en MetFrag y en Metlin, los cuales también coinciden en la identificación de este metabolito, siendo los ID del metabolito en las bases de datos C18905 y 328604, respectivamente.

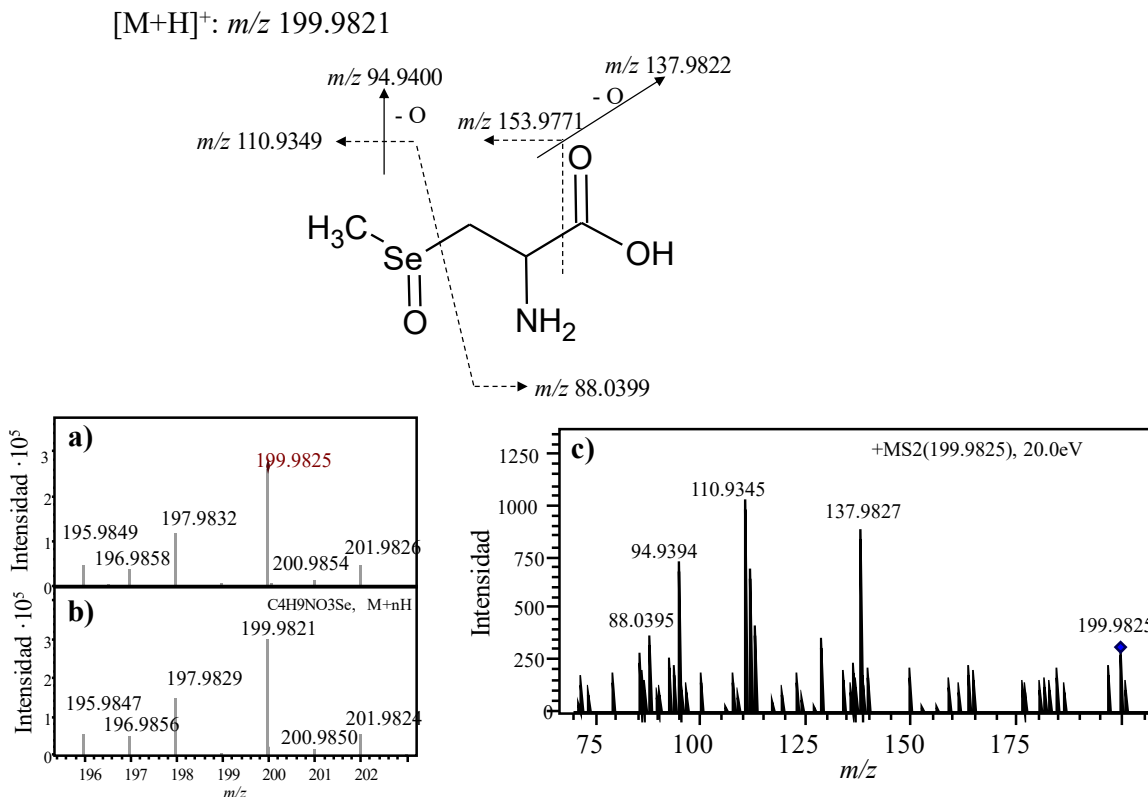


Fig. 5. 2: Identificación y fragmentación propuesta de MeSeCysO, producto de la reacción de alanina, AMSe y PLP. a) Patrón isotópico obtenido de la reacción Ala+AMSe+PLP analizada mediante ESI(+)-Q-TOF-MS. b) Patrón isotópico protonado $[M+H]^+$ de la fórmula molecular de MeSeCysO ($C_4H_9NO_3Se$). c) Espectro MS/MS del ion m/z 199.9825

La identificación de este compuesto es de gran relevancia, debido a que se demuestra que una parte fundamental para la síntesis de MeSeCys es mediante la incorporación de metilselenio en el aminoácido alanina. Bajo este razonamiento, y conforme a la identificación de MeSeCys y MeCys como metabolitos que aumentan con respecto a la cantidad de Se(IV) a la que se expusieron las cebollas, nos condujo a que la MeCys se estará sintetizando mediante la misma ruta metabólica, y utilizando sustratos similares, además de involucrar procesos de transaminación debido a la necesidad de utilizar PLP para que se lleve a cabo la reacción. Cabe mencionar que el PLP es un cofactor importante de varias enzimas que catalizan reacciones de eliminación y/o sustitución de aminoácidos en la posición β y que este mecanismo ha sido importante en la formación de varios aminoácidos a partir de la Ala [316]. El hecho de que la síntesis de MeSeCysO *in vitro* se observó solamente en presencia de AMSe y no de Se(IV) indica que, en el mecanismo propuesto, la metilación de Se(IV) efectivamente precede a la síntesis de MeSeCysO y MeSeCys. El esquema de la reacción de síntesis *in vitro* de la MeSeCysO a partir de Ala y AMSe en presencia de PLP, se presenta en la Fig. 5.3 (arriba).

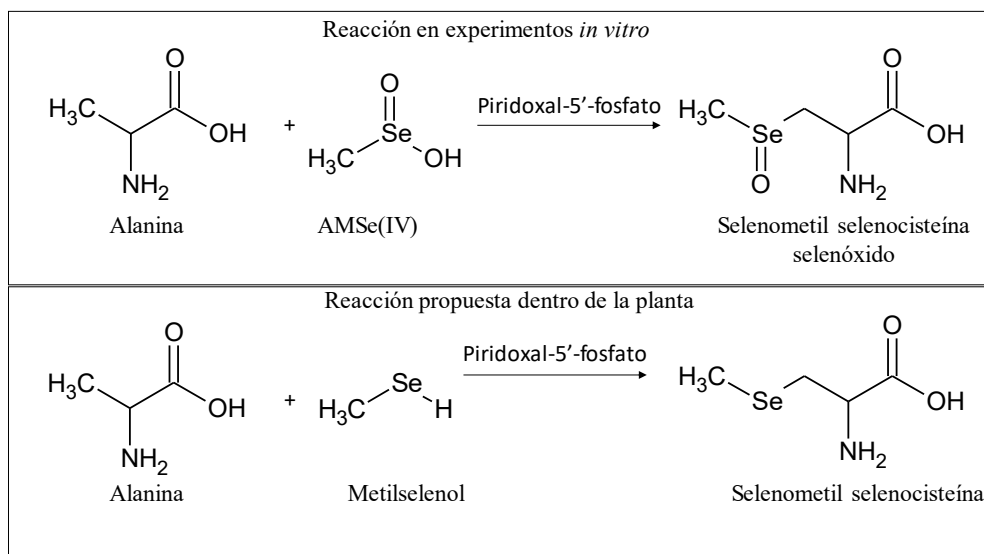


Fig. 5. 3: Reacción producida en mezclas *in vitro* para producir MeSeCysO y reacción propuesta para la síntesis de MeSeCys en plantas expuestas a Se.

Ip et al [317] sintetizaron ácido metilselenínico (AMSe) como un análogo estable del metilselenol (CH_3SeH) y este compuesto ha sido empleado en diferentes reacciones realizadas *in vitro*. El metilselenol es un intermediario en el metabolismo de asimilación de Se en distintos organismos, sin embargo, debido a su baja estabilidad, resulta difícil su uso fuera de los sistemas biológicos; es por ello que en varios estudios anteriores y también en este trabajo, se utilizó AMSe. Considerando la presencia de CH_3SeH en la planta, este sería utilizado como sustrato en vez del AMSe, y en la parte inferior de la Fig. 5.3 se presenta la propuesta de la síntesis de MeSeCysO *in vivo*. En cuanto a la similitud de síntesis de Se- y S-análogos, es importante mencionar que la síntesis de MeCys puede llevarse a cabo a partir de metanetiol (CH_3SH) y O-AcSer, tanto *in vitro* como en sistemas biológicos donde se presentan bajos niveles de Cys [318]

7.4. Conclusiones

Los datos obtenidos al analizar las mezclas de reacción preparadas mediante ESI(+)-Q-TOF-MS, mostraron la síntesis de MeSeCysO a partir de ácido metilselenínico (AMSe), alanina y fosfato de piridoxal (PLP) mientras que, utilizando Se(IV) como sustrato, no se observó ninguna reacción química. Estos resultados indican que el primer paso en la síntesis de MeSeCys, MeSeCysO y sus respectivos análogos de azufre, podría ser la metilación de Se(IV) o S(IV), seguida por la incorporación de $\text{CH}_3\text{Se}=\text{O}$ o $\text{CH}_3\text{S}=\text{O}$ en la posición beta de la alanina con ayuda de PLP. Este mecanismo de síntesis de MeSeCysO, MeSeCys, MeCysO y MeCys (Fig. 5.2) podría ser considerado como un mecanismo alternativo de la ruta de metilación de SeCys o Cys la cual es ampliamente aceptada.

8. Conclusiones

El enfoque central de este trabajo de tesis ha sido contribuir en el avance del análisis de muestras químicamente complejas, realizados en el ámbito de las ciencias “ómicas”. Las muestras analizadas fueron orinas humanas, tortillas de maíz, vinos tintos y raíces de cebolla. En cada uno de los casos se adoptaron/desarrollaron procedimientos de pretratamiento de muestra, se establecieron las condiciones del análisis instrumental y se realizó el análisis de datos, obteniéndose resultados de relevancia en las áreas de metabolómica y foodómica.

En la primera parte de la tesis, se utilizó el sistema capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS para llevar a cabo un estudio metabólico no dirigido de orinas, comparando los pacientes con síndrome metabólico (SM) contra un grupo control. La finalidad de esta parte del proyecto de tesis fue identificar los metabolitos que pudieran ser propuestos como biomarcadores potenciales del SM. Con base en los resultados obtenidos y el análisis de datos soportado en diversos programas y bases de datos, se identificaron los siguientes compuestos que presentaron una mayor abundancia en el grupo de individuos con SM respecto del grupo control: ácido indol-3-acético, ácido indol-3-acético-O-glucurónido, N-(indol-3-ilacetil) glutamina, indol-3-carbaldehído, ácido indol-3-carboxílico e hidroxihexanoicarnitina. Cabe resaltar que cinco de ellos pertenecen a compuestos indólicos derivados del catabolismo de triptófano, por lo tanto, se propone que las rutas metabólicas que involucran a estos compuestos se encuentran alteradas en el SM. Además de representar un avance importante en el entendimiento y aportar evidencias en la etiología del SM, estos resultados demostraron la utilidad de las herramientas de química analítica utilizadas en la búsqueda de biomarcadores potenciales para desarrollar en un futuro un diagnóstico rápido y sencillo basado en la cuantificación de compuestos derivados de indol. Específicamente, se propone implementar un proceso de hidrólisis de orinas con el objetivo de liberar el 3IAA de sus conjugados, para posteriormente cuantificar este metabolito mediante cromatografía de líquidos con detección fluorimétrica y, en un grupo mayor de individuos, definir las concentraciones para diagnosticar esta enfermedad.

La siguiente parte del proyecto se enfocó en productos alimenticios como tortillas, vinos y cebollas. Particularmente, en el caso de las muestras de tortillas y vinos se analizaron los perfiles de metales/metaloideos, utilizando espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas sostenido por nitrógeno (MP-AES). En el caso de tortillas, se finalizó el trabajo iniciado durante la tesis de maestría, desarrollando un procedimiento de determinación de arsénico inorgánico (iAs), la especie de este elemento de mayor toxicidad. Para llevar a cabo la separación se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) de intercambio aniónico modificados con AgCl. Se utilizó generación de hidruros para la introducción de muestras a MP-AES y se propuso agregar Te(IV) como estándar interno para corregir errores aleatorios durante la generación de hidruros, su transporte y medición de As por MP-AES. Se lograron porcentajes de recuperación de iAs en las muestras de un 73 %, aunque se demostró la factibilidad de separar y preconcentrar iAs en muestras menos complejas que tortilla. Estos resultados serán de gran utilidad en el desarrollo de procedimientos con SPE en muestras de alimentos, pues además de ser una técnica con costos menores a otras, sigue habiendo pocas aplicaciones de este tipo reportados en la bibliografía. En el siguiente caso se analizaron vinos, ya que la determinación del perfil de elementos en este tipo de muestras es relevante desde el punto de vista de sus propiedades organolépticas, control de calidad y en estudios de proveniencia de vinos. Se llevó a cabo la cuantificación de K, Na, Ca, Mg, Fe, Al, Sr, Rb, Mn y Cu

en vinos procedentes de tres distintas zonas geográficas de México: Aguascalientes, Baja California y Guanajuato. Utilizando una simple dilución como pretratamiento de muestra, se exploraron diferentes métodos de cuantificación, los que incluyeron calibración externa, dilución de estándar (SDA), calibración multi-energía (MEC), y el método de adición de estándar (SA). Los métodos SDA y MEC se basan en la preparación de dos soluciones en presencia de la matriz; debido a esto, ambos permiten eliminar posibles interferencias espectrales y efectos de matriz, y también tienen ventajas con respecto a tiempos más cortos de análisis y de mayor simplicidad operacional respecto al método SA que es ampliamente aceptado. Mientras que MEC se basa en la lectura de las soluciones a distintas líneas de emisión de cada analito, SDA se basa en el monitoreo en tiempo real de la dilución entre dos soluciones. No obstante, los resultados de SDA no fueron satisfactorios, por lo cual se decidió hacer diversas modificaciones en el método como realizar cada punto de dilución en tubos de forma aislada, estableciéndose el método modificado (SDAM) que finalmente fue utilizado para la identificación de Al, Fe, Cu, Sr, Rb y Mn. Por otro lado, MEC se utilizó para determinar K, Na, Ca y Mg en las muestras. Una vez que se demostró la concordancia entre SDAM y MEC con los resultados obtenidos por SA, se utilizaron las concentraciones de los elementos obtenidas para evaluar la factibilidad de estos resultados en el estudio de procedencia de vinos mexicanos. Para ello, se utilizó el método de análisis de componentes principales (PCA), obteniéndose una clara agrupación entre las muestras pertenecientes a la misma región, por lo que se demostró la posibilidad de llevar a cabo la determinación del origen geográfico de las muestras con base en la cuantificación de estos elementos. Específicamente, los elementos relacionados con las muestras provenientes de Guanajuato fueron K, Rb, Sr y Ca, mientras que Mn y Na fueron los elementos relacionados con las muestras de Valle de Guadalupe (estado de Baja California). En esta parte del proyecto se demostró la gran capacidad que posee el MP-AES, el cual es importante para el análisis de productos alimenticios, siendo un equipo de gran versatilidad que además presenta costos de operación más bajos en comparación con otras técnicas de espectrometría atómica.

La última parte de la tesis ha sido centrada en la evaluación del impacto de Se(IV) en plantas comestibles a nivel metabólico. Debido a la relevancia de ciertos metabolitos de Se para la salud humana, los resultados obtenidos son también de potencial interés en el área de foodómica. En primer lugar, se realizó un estudio bibliográfico sobre este tema y a continuación, se estudió el efecto del Se(IV) en las raíces de cebolla, utilizando para ello las técnicas GC-MS, capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS y ESI(+)-Q-TOF-MS. Con ayuda de la técnica GC-MS, se estudiaron los metabolitos volátiles producidos en el headspace de cultivos de cebollas expuestas a Se(IV) y cultivos control, no-expuestos, utilizando microextracción en fase sólida (SPME). Se logró la identificación de una serie de compuestos volátiles de azufre, de entre los cuales se destacan por tener una mayor abundancia en el grupo control con respecto al grupo expuesto los siguientes metabolitos: dipropiltrisulfuro, 3, 5-dietil-1,2,4-tritriolano, propilmercaptano y metil-2-propenildisulfuro. La mayor abundancia de estos metabolitos en el grupo control indica la alteración de las rutas metabólicas de azufre en el grupo expuesto a Se(IV), lo cual supone la retención de metabolitos de azufre en los tejidos debido a que no son desechados mediante las rutas de volatilización en las cebollas expuestas. Por otro lado, se identificaron compuestos volátiles de Se en el grupo expuesto, los cuales fueron: DMSe, MeAlilSe, MSeSM, DMDS₂, MPeSe y PrSeSM. La presencia de metabolitos selenosulfenatos en *Allium cepa* L. es novedoso, puesto que sólo existen reportes de este tipo de compuestos en hojas de *Allium fistulosum*, en plantas *Brassica juncea*, en algas *Isochrysis galbana*, y en cultivos de *Escherichia coli*. Se propone que su presencia se debe a la interacción entre compuestos volátiles de Se con aquellos

de azufre en fase gaseosa; cabe mencionar que DPDS, DMS, DMSe y DMSe se encuentran con una alta abundancia en el grupo de cebollas expuestas a Se(IV) lo que sustenta la posibilidad de su participación en la formación de selenosulfenatos en el headspace. Además de los experimentos de fitovolatilización, se llevó a cabo el análisis de metabolitos en las raíces de cebollas. Para esto, los extractos etanólicos de las raíces se derivatizaron con etilclorofornato y se analizaron mediante capHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS y también mediante GC-MS. En este caso se lograron identificar varios metabolitos de azufre que aumentaron en el grupo de cebollas expuestas, entre los cuales destacan: metilcisteína, ácido 2-amino sulfanilacético (2ASA), S-alilcisteína, cistina, homocisteína. Esto indica que los metabolitos de azufre en el grupo expuesto no son metabolizados subsecuentemente por las rutas de volatilización, lo cual coincide con la disminución de compuestos volátiles de azufre en el grupo expuesto en comparación con el grupo control. Además de 2ASA, se observó el aumento del ácido 2-selanilideneacético en el grupo de cebollas expuestas; estos dos compuestos hasta donde sabemos, es la primera vez que se identifican en muestras de cebollas, e incluso existe escasa información sobre ellos. Por lo anterior, es importante en un futuro elucidar las propiedades y funciones que tienen estos metabolitos en las rutas de captación/metabolización de Se en plantas. Por otra parte, dos de los metabolitos de mayor importancia que aumentaron en raíces proporcionalmente a la cantidad de Se(IV) suministrada en el medio, fueron MeSeCys y MeCys. Por lo anterior, y debido a que dichos compuestos presentan una analogía estructural, se propuso que provienen de las mismas rutas metabólicas; para avanzar en este tema, se llevaron a cabo experimentos adicionales *in vitro*. Se prepararon diferentes mezclas de reacción utilizando Se(IV), AMSe, alanina, glicina, cistina, cisteína, glutatión, fosfato de piridoxal, piridoxal, O-fosfoserina, o acetilserina, las cuales fueron incubadas y después analizadas mediante ESI(+)-Q-TOF-MS. De las mezclas preparadas, solamente aquellas que contenían AMSe como fuente de Se presentaron la formación de otras especies de este elemento. Específicamente, se observó la incorporación de la parte $\text{CH}_3\text{Se}=\text{O}$ de la molécula del AMSe en el grupo tiol, o en la posición beta de los aminoácidos, en presencia de fosfato de piridoxal. Un resultado importante fue la formación de MeSeCysO en la mezcla constituida de alanina, AMSe y fosfato de piridoxal, dicho compuesto fue confirmado con ayuda de su patrón isotópico, masa exacta, y patrón de fragmentación MS/MS en bases de datos y programas como MetFrag y Metlin. Por lo anterior y debido a que AMSe es un análogo estable del metilselenol, del cual se sabe que es un compuesto fundamental en el metabolismo de Se, se propuso que la ruta alterna para la síntesis de MeSeCys *in vivo* se lleva a cabo a partir de alanina y metilselenol en presencia de fosfato de piridoxal. Esta evidencia es de gran relevancia puesto que es ampliamente aceptado que la formación de MeSeCys ocurre por la metilación directa de la SeCys, y nuestros resultados aportan un gran avance en la comprensión del metabolismo y captación de Se en plantas.

En resumen, con el proyecto de tesis se ha contribuido en el desarrollo de procedimientos analíticos útiles en el análisis de muestras químicamente complejas. En la aplicación de dichos procedimientos para el análisis de diferentes tipos de muestras, se obtuvieron resultados de relevancia en las áreas de metabolómica y foodómica. Se demostró la gran versatilidad que proporciona el MP-AES para la determinación de metales/metaloides en matrices alimenticias. Por otro lado, mediante la aplicación de espectrometría de masas con y sin separación cromatográfica, se generaron datos novedosos en el estudio del síndrome metabólico, así como del metabolismo de Se en plantas. Se debe remarcar la importancia que tuvo el uso de los programas y plataformas como MetaboScape, XCMS y MetFrag para el análisis de datos, así como para la identificación y anotación de compuestos relevantes en las

áreas de metabolómica no dirigida y foodómica, cuyo manejo es indispensable para la investigación de estas áreas.

Bibliografía

1. Capozzi, F. and A. Bordoni, *Foodomics: a new comprehensive approach to food and nutrition*. Genes & nutrition, 2013. **8**(1): p. 1-4.
2. Gemperline, E., C. Keller, and L. Li, *Mass spectrometry in plant-omics*. Analytical chemistry, 2016. **88**(7): p. 3422-3434.
3. Herrero, M., et al., *Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition*. Mass spectrometry reviews, 2012. **31**(1): p. 49-69.
4. Lederberg, J. and A.T. McCray, *Ome SweetOmics--A Genealogical Treasury of Words*. The Scientist, 2001. **15**(7): p. 8-8.
5. Hu, C. and G. Xu, *Mass-spectrometry-based metabolomics analysis for foodomics*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **52**: p. 36-46.
6. Girolamo, F.D., et al., *The role of mass spectrometry in the "omics" era*. Current organic chemistry, 2013. **17**(23): p. 2891-2905.
7. Jones, O.A.H., et al., *The use of metabolomics in the study of metals in biological systems*. Metallomics, 2015. **7**(1): p. 29-38.
8. Jones, D.L., *Organic acids in the rhizosphere—a critical review*. Plant and soil, 1998. **205**(1): p. 25-44.
9. Mudgal, V., et al., *Effect of toxic metals on human health*. Open Nutraceuticals J, 2010. **3**: p. 94-99.
10. García-Cañas, V., et al., *Present and future challenges in food analysis: foodomics*. Analytical chemistry, 2012. **84**(23): p. 10150-10159.
11. Vallverdú-Queralt, A. and R.M. Lamuela-Raventós, *Foodomics: A new tool to differentiate between organic and conventional foods*. Electrophoresis, 2015.
12. Ibáñez, C., et al., *Metabolomics, peptidomics and proteomics applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry in foodomics: A review*. Analytica chimica acta, 2013. **802**: p. 1-13.
13. Inoue, K., et al., *Principal component analysis of molecularly based signals from infant formula contaminations using LC-MS and NMR in foodomics*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016.
14. Skoog, D.A.W., Donald M.; Holler, F. James; Crouch, Stanley R., *Fundamentals of analytical chemistry*. Ninth ed, ed. B.C.C. Learning. 2014.
15. Feng, X., et al., *Mass spectrometry in systems biology: an overview*. Mass spectrometry reviews, 2008. **27**(6): p. 635-660.
16. Munson, M.S.B. and F.H. Field, *Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction*. Journal of the American Chemical Society, 1966. **88**(12): p. 2621-2630.
17. Strupat, K., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of proteins electroblotted after polyacrylamide gel electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(4): p. 464-470.
18. Baldwin, M.A., *Mass spectrometers for the analysis of biomolecules*. Methods in enzymology, 2005. **402**: p. 3-48.
19. Torgerson, D.F., R.P. Skowronski, and R.D. Macfarlane, *New approach to the mass spectroscopy of non-volatile compounds*. Biochemical and biophysical research communications, 1974. **60**(2): p. 616-621.
20. Comisarow, M.B. and A.G. Marshall, *Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy*. Chemical physics letters, 1974. **25**(2): p. 282-283.
21. March, R.E. and J.F.J. Todd, *Practical Aspects of Trapped Ion Mass Spectrometry, Volume V: Applications of Ion Trapping Devices*. 2016: CRC Press.
22. Smith, R., et al., *Proteomics, lipidomics, metabolomics: a mass spectrometry tutorial from a computer scientist's point of view*. BMC bioinformatics, 2014. **15**(7): p. 1.

23. APA. *Enfermedades crónicas*. 2017 [cited 2017 18 enero]; Available from: <http://www.apa.org/centrodeapoyo/cronicas.aspx>.
24. Elflein, J. *Deaths caused by chronic diseases 2016*. 2020 [cited 2020 June 21th]; Available from: <https://www.statista.com/statistics/265089/deaths-caused-by-chronic-diseases-worldwide/#statisticContainer>.
25. Biddinger, S.B., et al., *Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome*. *Diabetes*, 2005. **54**(5): p. 1314-1323.
26. Grundy, S.M., *Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006. **47**(6): p. 1093-1100.
27. Knutsson, A. and H. Bøggild, *Shiftwork and cardiovascular disease: review of disease mechanisms*. *Reviews on environmental health*, 2000. **15**(4): p. 359-372.
28. Ettehad, D., et al., *Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis*. *The Lancet*, 2016. **387**(10022): p. 957-967.
29. Weitzman, M., et al., *Tobacco smoke exposure is associated with the metabolic syndrome in adolescents*. *Circulation*, 2005. **112**(6): p. 862-869.
30. Alberti, K., et al., *Harmonizing the metabolic syndrome a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity*. *Circulation*, 2009. **120**(16): p. 1640-1645.
31. Kaur, J., *A comprehensive review on metabolic syndrome*. *Cardiology research and practice*, 2014. **2014**.
32. Dumas, M.E., J. Kinross, and J.K. Nicholson, *Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(1): p. 46-62.
33. Salud, S.d. *Sabes, cómo prevenir el Síndrome metabólico*. 2016 [cited 2020 June 22th]; Available from: <https://www.gob.mx/salud/articulos/sabes-como-prevenir-el-sindrome-metabolico>.
34. Salud, S.d. *Síndrome metabólico afecta calidad de vida en jóvenes y adolescentes*. 2016 [cited 2020 June 22th]; Available from: <https://www.gob.mx/salud/prensa/sindrome-metabolico-afecta-calidad-de-vida-en-jovenes-y-adolescentes>.
35. Yu, Z.-r., et al., *A HPLC-Q-TOF-MS-based urinary metabolomic approach to identification of potential biomarkers of metabolic syndrome*. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 2014. **34**(2): p. 276-283.
36. Lankinen, M., et al., *Dietary carbohydrate modification alters serum metabolic profiles in individuals with the metabolic syndrome*. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2010. **20**(4): p. 249-257.
37. Salek, R.M., et al., *A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human*. *Physiological genomics*, 2007. **29**(2): p. 99-108.
38. Tulipani, S., et al., *Metabolomics unveils urinary changes in subjects with metabolic syndrome following 12-week nut consumption*. *Journal of proteome research*, 2011. **10**(11): p. 5047-5058.
39. Ng, D.P.K., et al., *A metabolomic study of low estimated GFR in non-proteinuric type 2 diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2012. **55**(2): p. 499-508.
40. Xu, F., et al., *Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013. **98**(6): p. E1060-E1065.
41. Wang, C., et al., *Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and multivariate statistical analysis*. *Analytical chemistry*, 2005. **77**(13): p. 4108-4116.

42. Suhre, K., et al., *Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting*. PloS one, 2010. **5**(11): p. e13953.
43. Floegel, A., et al., *Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach*. Diabetes, 2013. **62**(2): p. 639-648.
44. Brenton, A.G. and A.R. Godfrey, *Accurate mass measurement: terminology and treatment of data*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(11): p. 1821-1835.
45. Carić, D., et al., *Absorption and fluorescence spectra of ring-substituted indole-3-acetic acids*. Biophysical chemistry, 2004. **111**(3): p. 247-257.
46. Agus, A., J. Planchais, and H. Sokol, *Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease*. Cell Host Microbe, 2018. **23**: p. 716-724.
47. Morris, G., et al., *The role of the microbial metabolites including tryptophan catabolites and short chain fatty acids in the pathophysiology of immune-inflammatory and neuroimmune disease*. Mol Neurobiol, 2017. **54**(6): p. 4432–4451.
48. Mallmann, N.H., E.S. Lima, and P. Lalwani, *Dysregulation of tryptophan catabolism in metabolic syndrome*. Metab Syndr Relat D, 2018. **16**(2): p. 1-8.
49. Badawy, A.A.B., *Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects*. Int J Tryptophan Res, 2017. **10**: p. 1178646917691938.
50. Rebnord, E.W., et al., *The kynurenine: tryptophan ratio as a predictor of incident type 2 diabetes mellitus in individuals with coronary artery disease*. Diabetologia, 2017. **60**(9): p. 1712-1721.
51. Badawy, A.A.B. and G. Guillemin, *The plasma [kynurenine]/[tryptophan] ratio and indoleamine 2, 3-dioxygenase: Time for appraisal*. Int J Tryptophan Res, 2019. **12**: p. 1178646919868978.
52. Law, K.P., et al., *Tryptophan and purine metabolites are consistently upregulated in the urinary metabolome of patients diagnosed with gestational diabetes mellitus throughout pregnancy: A longitudinal metabolomics study of Chinese pregnant women part 2*. Clin Chim Acta, 2017. **468**: p. 126-139.
53. Oh, J.S., et al., *Urinary profiling of tryptophan and its related metabolites in patients with metabolic syndrome by liquid chromatography-electrospray ionization/mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2017. **409**(23): p. 5501-5512.
54. Khamis, M.M., D.J. Adamko, and A. El-Aneed, *Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery*. Mass Spectrom Rev, 2017. **36**(2): p. 115-134.
55. Zhao, H., et al., *Identification of essential hypertension biomarkers in human urine by non-targeted metabolomics based on UPLC-Q-TOF/MS*. Clin Chim Acta, 2018. **486**: p. 192-198.
56. Wang, Y., et al., *Urinary metabolomic study of patients with acute coronary syndrome using UPLC-QTOF/MS*. J Chromatogr B, 2018. **1100**: p. 122-130.
57. Taleb, S., *Tryptophan dietary impacts gut barrier and metabolic diseases*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2113.
58. Roager, H.M. and T.R. Licht, *Microbial tryptophan catabolites in health and disease*. Nat Commun, 2018. **9**: p. 3294.
59. Rahim, M.B.H.A., et al., *Diet-induced metabolic changes of the human gut microbiome: importance of short-chain fatty acids, methylamines and indoles*. Acta Diabetol, 2019. **56**(5): p. 493-500.
60. Cosola, C., et al., *Microbiota metabolites: Pivotal players of cardiovascular damage in chronic kidney disease*. Pharmacol Res, 2018. **130**: p. 132-142.
61. Pavlova, T., et al., *Urinary intermediates of tryptophan as indicators of the gut microbial metabolism*. Anal Chim Acta, 2017. **987**: p. 72-80.
62. Anesi, A., et al., *Metabolic profiling of human plasma and urine, targeting tryptophan, tyrosine and branched chain amino acid pathways*. Metabolites, 2019. **9**: p. 261.
63. Durantou, F., et al., *Normal and pathologic concentrations of uremic toxins*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(7): p. 1258–1270.

64. Korsholm, A.S., et al., *Comprehensive metabolomic analysis in blood, urine, fat, and muscle in men with metabolic syndrome: a randomized, placebo-controlled clinical trial on the effects of resveratrol after four months' treatment*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(3): p. 554.
65. Kałużna-Czaplińska, J., et al., *How important is tryptophan in human health?* *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019. **59**(1): p. 72-88.
66. Matsuoka, K., et al., *Concentrations of various tryptophan metabolites are higher in patients with diabetes mellitus than in healthy aged male adults*. *Diabet Int*, 2017. **8**(1): p. 69-75.
67. Takada, A., et al., *Measurement of tryptophan metabolites in healthy old men and pPatients of type 2 diabetes mellitus (T2DM)*. *Food Nutr Sci*, 2018. **9**(10): p. 1206-1220.
68. Lamas, B., J.M. Natividad, and H. Sokol, *Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity*. *Mucosal Immunol*, 2018. **11**(4): p. 1024-1038.
69. Velasquez, M.T., et al., *Gut microbiota and cardiovascular uremic toxicities*. *Toxins*, 2018. **10**(7): p. 287.
70. Li, H., et al., *Modified metabolites mapping by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry using full scan/all ion fragmentation/neutral loss acquisition*. *J Chromatogr A*, 2019. **1583**: p. 80-87.
71. Rabassa, M., et al., *Habitual nut exposure, assessed by dietary and multiple urinary metabolomic markers, and cognitive decline in older adults: the InCHIANTI study*. *Mol Nutr & Food Res*, 2020. **64**: p. 1900532.
72. Men, L., et al., *Urine metabolomics of high-fat diet induced obesity using UHPLC-Q-TOF-MS*. *J Pharm Biomed Anal*, 2017. **132**: p. 258-266.
73. Xu, J., et al., *Effects of Bailing capsule on diabetic nephropathy based on UPLC-MS urine metabolomics*. *RSC Adv*, 2019. **9**(62): p. 35969-35975.
74. Huang, M., et al., *Identification of coronary heart disease biomarkers with different severities of coronary stenosis in human urine using non-targeted metabolomics based on UPLC-Q-TOF/MS*. *Clin Chim Acta*, 2019. **497**: p. 95-103.
75. Miao, H., et al., *Urinary biomarker and treatment mechanism of Rhizoma Alismatis on hyperlipidemia*. *Biomed Chromatogr*, 2017. **31**(4): p. e3829.
76. Boulangé, C.L., et al., *NMR and MS urinary metabolic phenotyping in kidney diseases is fit-for-purpose in the presence of a protease inhibitor*. *Molec Omics*, 2019. **15**(1): p. 39-49.
77. Fairulnizal, M.N.M., et al., *Atomic absorption spectroscopy for food quality evaluation, in Evaluation Technologies for Food Quality*. 2019, Elsevier. p. 145-173.
78. Martínez-Ballesta, M.C., et al., *Minerals in plant food: effect of agricultural practices and role in human health. A review*. *Agronomy for sustainable development*, 2010. **30**(2): p. 295-309.
79. Clemens, S. and J.F. Ma, *Toxic heavy metal and metalloids accumulation in crop plants and foods*. *Annual review of plant biology*, 2016. **67**: p. 489-512.
80. Khan, M.J., et al., *Effect of amendments on chemical immobilization of heavy metals in sugar mill contaminated soils*. *Soil & Environment*, 2012. **31**(1).
81. Prasad, K.S., et al., *Monitoring of Heavy Metal Contamination in Fodders, Feeds and Milk in Gulbarga District of Karnataka*. 2020.
82. Tariba, B., *Metals in wine—impact on wine quality and health outcomes*. *Biological Trace Element Research*, 2011. **144**(1-3): p. 143-156.
83. Zaza, S., et al., *Human exposure in Italy to lead, cadmium and mercury through fish and seafood product consumption from Eastern Central Atlantic Fishing Area*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015. **40**: p. 148-153.
84. de Alda-Garcilope, C., et al., *Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin "Miel de Granada" according to their mineral content*. *Food chemistry*, 2012. **135**(3): p. 1785-1788.
85. Ramtahal, G., et al., *Cost-effective method of analysis for the determination of cadmium, copper, nickel and zinc in cocoa beans and chocolates*. *Journal of Food Research*, 2015. **4**(1): p. 193.

86. Kazi, T.G., et al., *Evaluation of toxic elements in baby foods commercially available in Pakistan*. Food chemistry, 2010. **119**(4): p. 1313-1317.
87. Khan, A., et al., *The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review*. Environmental Science and Pollution Research, 2015. **22**(18): p. 13772-13799.
88. Tejera, R.L., et al., *Metals in wheat flour; comparative study and safety control*. Nutricion hospitalaria, 2013. **28**(2): p. 506-513.
89. Cifuentes, A., *Food analysis: present, future, and foodomics*. ISRN Analytical Chemistry, 2012. **2012**.
90. Taylor, A., *Atomic Spectroscopy, Biomedical Applications*. 2017.
91. Yeung, V., D.D. Miller, and M.A. Rutzke, *Atomic Absorption Spectroscopy, Atomic Emission Spectroscopy, and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, in *Food Analysis*. 2017, Springer. p. 129-150.
92. Bundschuh, J., A. Pérez Carrera, and M.I. Litter, *Iberoarsen. Distribución del arsénico en las regiones ibéricas e iberoamericana*. 2008, Argentina: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).
93. Tyson, J., *The determination of arsenic compounds: A critical review*. ISRN Anal Chem, 2013: p. Article ID 835371.
94. Goessler, W. and D. Kuehnelt, *Analytical methods for the determination of arsenic and arsenic compounds in the environment*, in *Environmental chemistry of arsenic*, W.T.J. Frankenberger, Editor. 2002, Marcel Dekker: New York, USA. p. 27-50.
95. Wilson, S.C., et al., *The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review*. ELSEVIER. Environmental pollution, 2009: p. 1169-1181.
96. Tyson, J., *The determination of arsenic compounds: A critical review*. Hindawi Publishing Corporation, 2013: p. 1-24.
97. Mañay N., R.M.M., *Toxicología ambiental y ocupacional*. Universidad de Carabobo, 2011: p. 279-298.
98. Litter, M.I. and J. Bundschuh, *Iberoarsen. Situación del arsénico en la región de iberoamérica e iberoamericana. Posibles acciones articuladas e integradas para el abatimiento del arsénico en zonas aisladas*. 2010, Argentina: Ciencia y tecnología para el Desarrollo. (CYTED).
99. Litter, M.I., M.A. Armienta, and S.S. Fariás, *Iberoarsen. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos*. 2009, Argentina: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).
100. Authority, E.F.S., *Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population*. EFSA Journal, 2014. **12**(3): p. 1-68.
101. Nuss, E.T. and S.A. Tanumihardjo, *Maize: A paramount staple crop in the context of global nutrition*. Comp Rev Food ScinFood Safe, 2010. **9**: p. 417-436.
102. Carey, A.M., et al., *A review of recent developments in the speciation and location of arsenic and selenium in rice grain*. Anal Bioanal Chem, 2012. **402**(10): p. 3275-86.
103. Rosas-Castor, J.M., et al., *Evaluation of the transfer of soil arsenic to maize crops in suburban areas of San Luis Potosi, Mexico*. Sci Tot Environ, 2014. **497-498**: p. 153-162.
104. Rosas-Castor, J.M., et al., *Arsenic accumulation in maize crop (Zea mays): A review*. Sci Tot Environ, 2014. **488-489**: p. 176-187.
105. Williams, P.N., et al., *Increase in rice grain arsenic for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated arsenic in groundwaters*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(16): p. 4903-4908.
106. Ma, J.F., et al., *Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 9931-9935.
107. Zhao, F.J., et al., *Accumulation, distribution, and speciation of arsenic in wheat grain*. Environ Sci Technol, 2010. **44**(14): p. 5464-5468.

108. Horner, N.S. and D. Beauchemin, *The effect of cooking and washing rice on the bio-accessibility of As, Cu, Fe, V and Zn using an on-line continuous leaching method*. Anal Chim Acta, 2013. **758**: p. 28-35.
109. Signes-Pastor, A.J., et al., *Arsenic bioaccessibility in cooked rice as affected by arsenic in cooking water*. J Food Sci, 2012. **77**: p. T201-T206.
110. Raber, G., et al., *An improved HPLC-ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish*. Food Chem, 2012. **134**: p. 524-532.
111. de la Calle, M.B., et al., *Is it possible to agree on a value for inorganic arsenic in food? The outcome of IMEP-112*. Anal Bioanal Chem, 2012. **404**(8): p. 2475-88.
112. D'Amato, M., et al., *Arsenic speciation in wheat and wheat products using ultrasound- and microwave-assisted extraction and anion exchange chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. J Anal At Spectrom, 2011. **26**: p. 207-213.
113. Wrobel, K. and K. Wrobel, *Methodological aspects of speciation analysis in food products*, in *Handbook of Mineral Elements in food*, M. De la Guardia and S. Garrigues, Editors. 2015, John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK. p. 391-453.
114. Issa, N.B., et al., *Separation and determination of arsenic species in water by selective exchange and hybrid resins*. Analytica chimica acta, 2011. **706**(1): p. 191-198.
115. Arroyo, Y.R.R., et al., *Natural Decrease of Dissolved Arsenic in a Small Stream Receiving Drainages of Abandoned Silver Mines in Guanajuato, Mexico*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2013. **91**(5): p. 539-544.
116. Rosas-Castor, J.M., et al., *Arsenic accumulation in maize crop (Zea mays): a review*. Science of the Total Environment, 2014. **488**: p. 176-187.
117. Yang, G., et al., *Soil-to-crop transfer factors of tellurium*. Chemosphere, 2014. **111**: p. 554-559.
118. Chen, G. and T. Chen, *SPE speciation of inorganic arsenic in rice followed by hydride-generation atomic fluorescence spectrometric quantification*. Talanta, 2014. **119**: p. 202-206.
119. Mackenzie, D.E. and A.G. Christy, *The role of soil chemistry in wine grape quality and sustainable soil management in vineyards*. Water Science and Technology, 2005. **51**(1): p. 27-37.
120. Grindlay, G., et al., *Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications*. Analytica Chimica Acta, 2011. **691**(1-2): p. 18-32.
121. Pohl, P., *What do metals tell us about wine?* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2007. **26**(9): p. 941-949.
122. Mierczynska-Vasilev, A. and P.A. Smith, *Current state of knowledge and challenges in wine clarification*. Australian journal of grape and wine research, 2015. **21**: p. 615-626.
123. Coulter, A.D., et al., *Potassium bitartrate crystallisation in wine and its inhibition*. Australian journal of grape and wine research, 2015. **21**: p. 627-641.
124. Danilewicz, J.C., *Review of oxidative processes in wine and value of reduction potentials in enology*. American journal of enology and viticulture, 2012. **63**(1): p. 1-10.
125. Cabello-Pasini, A., et al., *Concentrations of calcium, magnesium, potassium, and sodium in wines from Mexico*. American journal of enology and viticulture, 2013. **64**(2): p. 280-284.
126. Birch, R.M., M. Ciani, and G.M. Walker, *Magnesium, calcium and fermentative metabolism in wine yeasts*. Journal of Wine Research, 2003. **14**(1): p. 3-15.
127. Jones, W.B., et al., *Standard dilution analysis*. Analytical chemistry, 2015. **87**(4): p. 2321-2327.
128. Virgilio, A., et al., *Multi-energy calibration applied to atomic spectrometry*. Analytica chimica acta, 2017. **982**: p. 31-36.
129. Espinoza-Cruz, T.L., *Uso de espectrometría de emisión atómica con excitación en plasma de microondas (MP-AES) para la determinación de metales traza y mayoritarios en materiales de relevancia para alimentos*, in *División de Ciencias Naturales y Exactas*. 2019, Universidad de Guanajuato: Guanajuato, Gto. p. 80.

130. Carrillo-Chávez, A., et al., *Environmental geochemistry of the Guanajuato mining district, Mexico*. Ore Geology Reviews, 2003. **23**(3-4): p. 277-297.
131. Dhillon, K.S. and S.K. Dhillon, *Distribution and management of seleniferous soils*. Adv Agron, 2003. **79**: p. 119-184.
132. Jiang, Y., et al., *Comparison of ATP sulfurylase 2 from selenium hyperaccumulator *Stanleya pinnata* and non-accumulator *Stanleya elata* reveals differential intracellular localization and enzyme activity levels*. BBA General Sub, 2018. **1862**(11): p. 2363-2371.
133. Guignardi, Z. and M. Schiavon, *Biochemistry of plant selenium uptake and metabolism*, in *Selenium in plants. Molecular, physiological, ecological and evolutionary aspects*, E.A.H. Pilon-Smits, L.H.E. Winkel, and Z.Q. Lin, Editors. 2017, Springer: Zurich, Switzerland. p. 21-34.
134. Gupta, M. and S. Gupta, *An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants*. Front Plant Sci, 2017. **7**.
135. Winkel, L.H.E., et al., *Selenium cycling across soil-plant-atmosphere interfaces: a critical review*. Nutrients, 2015. **7**: p. 4199-4239.
136. Malagoli, M., M. Schiavon, and E.A.H. Pilon-Smits, *Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality*. Front Plant Sci, 2015. **6**: p. 280.
137. Rayman, M., *Selenium and human health*. Lancet, 2012. **379**: p. 1256-1268.
138. Patra, A.R., et al., *Use of selenium as micronutrients and for future anticancer drug: a review*. The Nucleus, 2019: p. 1-12.
139. Kieliszek, M. and S. Błażej, *Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: a review*. Molecules, 2016. **21**(5): p. 609.
140. Wan, J., M. Zhang, and B. Adhikari, *Advances in selenium-enriched foods: from the farm to the fork*. Tr Food Sci Technol, 2018. **76**: p. 1-5.
141. Wiesner-Reinhold, M., et al., *Mechanisms of selenium enrichment and measurement in brassicaceous vegetables, and their application to human health*. Front Plant Sci, 2017. **8**: p. 1365.
142. Carvalho, S.M. and M.W. Vasconcelos, *Producing more with less: strategies and novel technologies for plant-based food biofortification*. Food Res Int, 2013. **54**(1): p. 961-971.
143. Van Hoewyk, D. and O. Çakir, *Manipulating selenium metabolism in plants: a simple twist of metabolic fate can alter selenium tolerance and accumulation*, in *Selenium in plants*, E.A.H. Pilon-Smits, L.H.E. Winkel, and Z.Q. Lin, Editors. 2017, Springer: Cham, Switzerland. p. 165-176.
144. Chomchan, R., S. Siripongvutikorn, and P. Puttarak, *Selenium bio-fortification: an alternative to improve phytochemicals and bioactivities of plant foods* Funct Food Health Dis, 2017. **7** (4): p. 263-279.
145. Gupta, M. and S. Gupta, *An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants*. Front Plant Sci, 2017. **7**: p. Art2074.
146. Kolbert, Z., et al., *"The roots" of selenium toxicity: A new concept*. PPlant Signal Behav, 2016. **11**(10).
147. Schiavon, M. and E.A.H. Pilon-Smits, *The fascinating facets of plant selenium accumulation—biochemistry, physiology, evolution and ecology*. New Phytol, 2017. **213**(4): p. 1582-1596.
148. Van Hoewyk, D., *A tale of two toxicities: malformed selenoproteins and oxidative stress both contribute to selenium stress in plants*. Ann Bot, 2013. **112**: p. 965–972.
149. Parihar, P., et al., *Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review*. Environ Sci Pollut Res, 2015. **22**(6): p. 4056-4075.
150. Wang, G., et al., *Regulation of the phenylpropanoid pathway: a mechanism of selenium tolerance in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings*. J Agric Food Chem, 2016. **64**(18): p. 3626-3635.
151. Bachiega, P., et al., *Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea Italica*) biofortified with selenium*. Food Chem, 2016. **190**: p. 771-776.
152. Zhang, C., et al., *Absorption, translocation and redistribution of selenium supplied at different growth stages of rice*. Int J Agric Biol, 2017. **19**(6): p. 1601-1607.

153. Tian, M., et al., *Untargeted metabolomics reveals predominant alterations in primary metabolites of broccoli sprouts in response to pre-harvest selenium treatment*. Food Res Int, 2018. **111**: p. 205-211.
154. Trolove, S.N., et al., *Development of a method for producing selenium-enriched radish sprouts*. LWT, 2018. **95**: p. 187-192.
155. D'Amato, R., et al., *Selenium biofortification in rice (*Oryza sativa* L.) sprouting: Effects on Se yield and nutritional traits with focus on phenolic acid profile*. J Agric Food Chem, 2018. **66**(16): p. 4082-4090.
156. Ruszczynska, A., et al., *Investigation of biotransformation of selenium in plants using spectrometric methods*. Spectrochim Acta Part B, 2017. **130**: p. 7-16.
157. Malheiros, R.S., et al., *Selenium downregulates auxin and ethylene biosynthesis in rice seedlings to modify primary metabolism and root architecture*. Planta, 2019.
158. Xieping, S., et al., *Effects of different concentrations of Se⁶⁺ on selenium absorption, transportation, and distribution of citrus seedlings (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng)*. J Plant Nutr, 2018. **41**(2): p. 168-177.
159. Schiavon, M., et al., *Selenium biofortification in radish enhances nutritional quality via accumulation of methyl-selenocysteine and promotion of transcripts and metabolites related to glucosinolates, phenolics, and amino acids*. Front Plant Sci, 2016. **7**: p. 1371.
160. Tognon, G.B., et al., *Mycorrhizal inoculation and/or selenium application affect post-harvest performance of snapdragon flowers*. Plant Growth Regul, 2016. **78**(3): p. 389-400.
161. Golubkina, N.A., et al., *Intersexual differences in plant growth, yield, mineral composition and antioxidants of spinach (*Spinacia oleracea* L.) as affected by selenium form*. Scientia horticulturae, 225, 350-358. Sci Hort, 2017. **225**: p. 350-358.
162. McKenzie, M.J., et al., *Selenium treatment differentially affects sulfur metabolism in high and low glucosinolate producing cultivars of broccoli (*Brassica oleracea* L.)*. Plant Physiol Biochem, 2017. **121**: p. 176-186.
163. Zhu, Z., et al., *Exploring the effects of selenium treatment on the nutritional quality of tomato fruit*. Food Chem, 2018. **252**: p. 9-15.
164. Mimmo, T., et al., *Selenium biofortification in *Fragaria* × *ananassa*: implications on strawberry fruits quality, content of bioactive health beneficial compounds and metabolomic profile*. Front Plant Sci, 2017. **8**: p. 1887.
165. Guardado-Félix, D., et al., *Selenium in germinated chickpea (*Cicer arietinum* L.) increases the stability of its oil fraction*. Plants, 2019. **8**(5): p. 113.
166. Tie, M., et al., *Selenium speciation in soybean by high performance liquid chromatography coupled o electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS)*. Microchem J, 2015. **123**: p. 70-75.
167. Ouerdane, L., et al., *Comprehensive speciation of low-molecular weight selenium metabolites in mustard seeds using HPLC–electrospray linear trap/orbitrap tandem mass spectrometry*. Metallomics, 2013. **5**(9): p. 1294-1304.
168. Puccinelli, M., F. Malorgio, and B. Pezzarossa, *Selenium enrichment of horticultural crops*. Molecules, 2017. **22**(6): p. 933.
169. Deng, X., et al., *Difference of selenium uptake and distribution in the plant and seleniumform in the grains of rice with foliar spray of selenite or selenate at differentstages*. Field Crop Res, 2017. **211**: p. 165-171.
170. El-Ramady, H., et al., *Selenium and nano-selenium in plant nutrition*. Environ Chem Lett, 2016. **14**(1): p. 123-147.
171. Dall'Acqua, S., et al., *Selenium biofortification differentially affects sulfur metabolism and accumulation of phytochemicals in two rocket species (*Eruca Sativa* Mill. and *Diplotaxis Tenuifolia*) grown in hydroponics*. Plants, 2019. **8**(3): p. 68.
172. Tian, M., et al., *Effects of selenium supplementation on glucosinolate biosynthesis in broccoli*. J Agric Food Chem, 2018. **66**(30): p. 8036-8044.

173. Sánchez-Rodas, D., et al., *Speciation analysis of Se-enriched strawberries (Fragaria ananassa Duch) cultivated on hydroponics by HPLC-TR-HG-AFS*. Microchem J, 2016. **127**: p. 120-124.
174. Farooq, M.U., et al., *Accumulation, mobilization, and transformation of selenium in rice grain provided with foliar sodium selenite*. J Sci Food Agric, 2019. **99**(6): p. 2892-2900.
175. Shahverdi, M.A., H. Omidi, and S.J. Tabatabaei, *Plant growth and steviol glycosides as affected by foliar application of selenium, boron, and iron under NaCl stress in Stevia rebaudiana Bertoni*. Ind Crops Prod, 2018. **125**: p. 408-415.
176. Fontanella, M.C., et al., *Selenium speciation profiles in biofortified sangiovese wine*. J Tr Elem Med Biol, 2017. **43**: p. 87-92.
177. Poblaciones, M.J., et al., *Agronomic selenium biofortification in Triticum durum under Mediterranean conditions: from grain to cooked pasta*. Food Chem, 2014. **146**: p. 378-384.
178. Yasin, M., et al., *Selenium-fortified wheat: potential of microbes for biofortification of selenium and other essential nutrients*. Int J Phytorem, 2015. **17**: p. 777-786.
179. Durán, P., et al., *Endophytic selenobacteria as new inocula for selenium biofortification*. Appl Soil Ecol, 2015. **96**: p. 319-326.
180. Bañuelos, G.S., et al., *Selenium biofortification of broccoli and carrots grown in soil amended with Se-enriched hyperaccumulator Stanleya pinnata*. Food Chem, 2015. **166**: p. 603-608.
181. Schiavon, M. and E.A.H. Pilon-Smits, *Selenium biofortification and phytoremediation phytotechnologies: a review*. J Environ Qual, 2017. **46**(1): p. 10-19.
182. Ogra, Y., et al., *Analysis of animal and plant selenometabolites in roots of selenium accumulator Brassica rapa var. peruviridis, by speciation*. Metallomics, 2013. **5**: p. 429-436.
183. Pilon-Smits, E.A.H., *Plant Se uptake and metabolism – How are hyperaccumulators different?*, in *Selenium in plants*, E.A.H. Pilon-Smits, L.H.E. Winkel, and Z.Q. Lin, Editors. 2017, Springer: Cham, Switzerland. p. 56-66.
184. Ogra, Y. and Y. Anan, *Selenometabolomics explored by speciation*. Biol Pharm Bull, 2012. **35**(11): p. 1863-1869.
185. Lima, L.W., E.A.H. Pilon-Smits, and M. Schiavon, *Mechanism of selenium hyperaccumulation in plants: A survey of molecular, biochemical and ecological cues*. BBA General Sub, 2018. **1862**(11): p. 2343-2353.
186. White, P.J., *Selenium metabolism in plants*. Biochim Biophys Acta (BBA)-General Subjects, 2018. **1862**(11): p. 2333-2342.
187. Jiang, Y., et al., *Characterization of selenium accumulation, localization and speciation in buckwheat—Implications for biofortification*. Front Plant Sci, 2018. **9**: p. 1583.
188. Doerfler, H., et al., *Granger causality in integrated GC-MS and LC-MS metabolomics data reveals the interface of primary and secondary metabolism*. Metabolomics, 2013. **9**(3): p. 564-574.
189. Lee, D.K., et al., *Comparison of primary and secondary metabolites for suitability to discriminate the origins of Schisandra chinensis by GC/MS and LC/MS*. Food Chem, 2013. **141**(4): p. 3931-3937.
190. Chaleckis, R., et al., *Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC-MS-based metabolomics*. Curr Opin Biotechnol, 2019. **55**: p. 44-50.
191. Moreno-Martin, G., et al., *In-vivo solid phase microextraction for quantitative analysis of volatile organoselenium compounds in plants*. Anal Chim Acta, 2019.
192. Ribeiro, D.M., et al., *Growth inhibition by selenium is associated with changes in primary metabolism and nutrient levels in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ, 2016. **39**(10): p. 2235-2246.
193. Elo, K., et al., *Untargeted metabolomics of tomato plants after root-knot nematode infestation*. J Agric Food Chem, 2016. **64**(29): p. 5963-5968.
194. Chen, Q., et al., *Metabolomics characterization of two Apocynaceae plants, Catharanthus roseus and Vinca minor, using GC-MS and LC-MS methods in combination*. Molecules, 2017. **22**(6): p. 997.

195. Beale, D.J., et al., *Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research*. *Metabolomics*, 2018. **14**(11): p. 152.
196. de Souza, L.P., et al., *From chromatogram to analyte to metabolite. How to pick horses for courses from the massive web-resources for mass spectral plant metabolomics*. *GigaScience*, 2017. **6**: p. 1-20.
197. Sarabia, L.D., et al., *Advances of Metabolite Profiling of Plants in Challenging Environments*. *Ann Plant Rev Online*, 2018. **1**(2): p. 1-45.
198. Misra, B.B., J.F. Fahrman, and D. Grapov, *Review of emerging metabolomic tools and resources: 2015-2016*. *Electrophoresis*, 2017. **38**: p. 2257–2274.
199. Parida, A.K., A. Panda, and J. Rangani, *Metabolomics-guided elucidation of abiotic stress tolerance mechanisms in plants.*, in *Plant metabolites and regulation under environmental stress*, P. Ahmad, et al., Editors. 2018, Academic Press. p. 89-131.
200. Mahieu, N.G., J.L. Genenbacher, and G.J. Patti, *A roadmap for the XCMS family of software solutions in metabolomics*. *Current opinion in chemical biology*, **30**, 87-93. *Curr Opin Chem Biokl*, 2016. **30**(1): p. 87-93.
201. Tiago, F.J., et al., *Mass spectrometry-based plant metabolomics: metabolite responses to abiotic stress*. *Mass Spectrom Rev*, 2016. **35**(5): p. 620–649
202. Longchamp, M., et al., *Variations in the accumulation, localization and rate of metabolization of selenium in mature Zea mays plants supplied with selenite or selenate*. *Food Chem*, 2015. **182**: p. 128-135.
203. Ogra, Y., Y. Ogiwara, and Y. Anan, *Comparison of the metabolism of inorganic and organic selenium species between two selenium accumulator plants, garlic and Indian mustard*. *Metallomics*, 2017. **9**: p. 61-68.
204. Di Tullo, P., et al., *Stable isotope tracing: a powerful tool for selenium speciation and metabolic studies in non- hyperaccumulator plants (ryegrass Lolium perenne L.)*. *Anal Bioanal Chem*, 2015. **407**: p. 9029–9042.
205. Bodnar, M., et al., *Methods of selenium supplementation: bioavailability and determination of selenium compounds*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2016. **56**(1): p. 36-55.
206. Lü, J., et al., *Cancer chemoprevention research with selenium in the post-SELECT era: Promises and challenges*. *Nutr Cancer*, 2016. **68**(1): p. 1-17.
207. Cui, L., et al., *Translocation and transformation of selenium in hyperaccumulator plant Cardamine ensliensis from Enshi, Hubei, China*. *Plant Soil*, 2018. **425**(1-2): p. 577-588.
208. González-Morales, S., et al., *Selenium and sulfur to produce Allium funtional crops*. *Molecules*, 2017. **22**: p. 558.
209. Pyrzynska, K. and A. Sentkowska, *Liquid chromatographic analysis of selenium species in plant materials*. *TRAC Trend Anal Chem*, 2019. **111**: p. 128-138.
210. Shah, M., J. Meija, and J.A. Caruso, *Relative mass defect filtering of high-resolution mass spectra for exploring minor selenium volatiles in selenium-enriched green onions*. *Anal Chem*, 2007. **79**: p. 846-853.
211. Kubachka, K.M., et al., *Selenium volatiles as proxy to the metabolic pathways of selenium in genetically modified Brassica juncea*. *Environ Sci Technol*, 2007. **41**(6): p. 1863-1869.
212. Aborode, F.A., et al., *Selenopeptides and elemental selenium in Thunbergia alata after exposure to selenite: quantification method for elemental selenium*. *Metallomics*, 2015. **7**: p. 1056-1066.
213. Sura-de Jong, M., et al., *Selenium hyperaccumulators harbor a diverse endophytic bacterial community characterized by high selenium resistance and plant growth promoting properties*. *Front Plant Sci*, 2015. **6**: p. 113.
214. Ogra, Y., et al., *Speciation of selenomethionie metabolites in wheat germ extract*. *Metallomics*, 2009. **1**: p. 78-86.

215. Aureli, F., et al., *Identification of selenosugars and other low-molecular weight selenium metabolites in high-selenium cereal crops*. *Metallomics*, 2012. **4**: p. 968–978.
216. Matich, A.J., et al., *Distribution of selenoglucosinolates and their metabolites in Brassica treated with sodium selenate*. *J Agric Food Chem*, 2015. **63**(7): p. 1896-1905.
217. Yin, H., et al., *Selenium forms and methods of application differentially modulate plant growth, photosynthesis, stress tolerance, selenium content and speciation in Oryza sativa L.* *Ecotoxicol Environ Safety*, 2019. **169**: p. 911-917.
218. Avila, W.F., et al., *Impact of selenium supply on Se-methylselenocysteine and glucosinolate accumulation in selenium-biofortified Brassica sprouts*. *Food Chem*, 2014. **165**: p. 578-586.
219. Wrobel, K., et al., *HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves - a potential dietary source of Se-methylselenocysteine*. *Food Chem*, 2004. **86**: p. 617-623.
220. Shao, S., et al., *Quantification of Se-methylselenocysteine and its γ -glutamyl derivative from naturally Se-enriched green bean (*Phaseolus vulgaris vulgaris*) after HPLC-ESI-TOF-MS and Orbitrap MSn-based identification*. *Food Anal Methods*, 2014. **7**: p. 1147–1157
221. Both, E.B., et al., *Selenolanthionine is the major water-soluble selenium compound in the selenium tolerant plant *Cardamine violifolia**. *Biochim Biophys Acta, Gen Subj*, 2018. **1862**: p. 2354-2362.
222. Marcinkowska, M. and D. Barańkiewicz, *Multielemental speciation analysis by advanced hyphenated technique–HPLC/ICP-MS: A review*. *Talanta*, 2016. **161**: p. 177-204.
223. Grotti, M., A. Terol, and J.L. Todoli, *Speciation analysis by small-bore HPLC coupled to ICP-MS*. *Trend Anal Chem*, 2014. **61**: p. 92-106.
224. Pröfrock, D. and A. Prange, *Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: a review of challenges, solutions, and trends*. *Appl Spectrosc*, 2012. **66**(8): p. 843-868.
225. Balcaen, L., et al., *Inductively coupled plasma–Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra) trace elements–A tutorial review*. *Anal Chim Acta*, 2015. **894**: p. 7-19.
226. Gao, H.H., et al., *Separation of selenium species and their sensitive determination in rice samples by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography with inductively coupled plasma tandem mass spectrometry*. *J Sep Sci*, 2018. **41**(2): p. 432-439.
227. Ni, Z., Y. Liu, and M. Qu, *Determination of 5 natural selenium species in selenium-enriched bamboo shoots using LC-ICP-MS*. *Food Sci Biotechnol*, 2014. **23**(4): p. 1049-1053.
228. Kapolna, E., et al., *Biofortification and isotopic labeling of Se metabolites in onions and carrots following foilar application of Se and ^{77}Se* . *Food Chem*, 2012. **133**(3): p. 650-657.
229. Thosaikham, W., et al., *Evaluation of selenium species in selenium-enriched pakchoi (*Brassica chinensis* Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) using mixed ion-pair reversed phase HPLC–ICP-MS*. *Food Chem*, 2014. **145**: p. 736-742.
230. Maneetong, S., et al., *Hydroponic cultivation of selenium-enriched kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra* L.) seedling and speciation of selenium with HPLC–ICP-MS*. *Microchem J*, 2013. **108**: p. 87-91.
231. Sentkowska, A. and K. Pyrzynska, *Hydrophilic interaction liquid chromatography in the speciation analysis of selenium*. *J Chromatogr B*, 2018. **1074-1075**: p. 8-15.
232. Gammelgaard, B., M.I. Jackson, and C. Gabel-Jensen, *Surveying selenium speciation from soil to cell-forms and transformations*. *Anal Bioanal Chem*, 2011. **399**(5): p. 1743-1763.
233. Montes-Bayón, M., M. Sharar, and M. Corte-Rodriguez, *Trends on (elemental and molecular) mass spectrometry based strategies for speciation and metallomics*. *TrAC Trend Anal Chem*, 2018. **104**(1): p. 4-10.
234. Vogiatzis, C.G. and G.A. Zachariadis, *Tandem mass spectrometry in metallomics and the involving role of ICP-MS detection: a review*. *Anal Chim Acta*, 2014. **819**: p. 1-14.

235. Chan, Q.L., S.E. Afton, and J.A. Caruso, *Investigation of selenium metabolites in se-enriched kale, Brassica oleracea a, via HPLC-ICPMS and nanoESI-ITMS*. J Anal At Spectrom, 2010. **25**: p. 186–192.
236. Matich, A.J., et al., *Selenoglucosinolates and their metabolites produced in Brassica spp. fertilised with sodium selenate*. Phytochemistry, 2012. **75**: p. 140-152.
237. Gionfriddo, E., et al., *A reliable solid phase microextraction-gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry method for the assay of selenomethionine and selenomethylselenocysteine in aqueous extracts: Difference between selenized and not-enriched selenium potatoes*. Anal Chim Acta, 2012. **747**: p. 58-66.
238. Tie, M., et al., *Identification and quantitation of seleno-amino acids in mung bean sprouts by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC–MS)*. Eur Food Res Technol, 2018. **244**(3): p. 491-500.
239. Eiche, E., et al., *Selenium distribution and speciation in plant parts of wheat (Triticum aestivum) and Indian mustard (Brassica juncea) from a seleniferous area of Punjab, India*. Sci Tot Environ, 2015. **505**: p. 952-961.
240. Wang, P., et al., *Synchrotron-based X-ray absorption near-edge spectroscopy imaging for laterally resolved speciation of selenium in fresh roots and leaves of wheat and rice*. J Exp Bot, 2015. **66**(15): p. 4795-4806.
241. Poschenrieder, C., et al., *Do toxic ions induce hormesis in plants?* Plant Sci, 2013. **212**: p. 15-25.
242. Cao, D., et al., *Transcriptome analysis of differentially expressed genes involved in selenium accumulation in tea plant (Camellia sinensis)*. . PLoS one, 2018. **13**(6): p. e0197506.
243. Tamaoki, M. and A. Maruyama-Nakashita, *Molecular mechanisms of selenium responses and resistance in plants*, in *Selenium in plants*, E.A.H. Pilon-Smits, L.H.E. Winkel, and Z.Q. Lin, Editors. 2017, Springer: Cham, Switzerland. p. 35-48.
244. Van Hoewyk, D., et al., *Transcriptome analysis give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in Arabidopsis*. Physiol Plant, 2008. **132**: p. 236-253.
245. Wang, J., et al., *Transcriptome-wide comparison of selenium hyperaccumulator and nonaccumulator Stanleya species provides new insight into key processes mediating the hyperaccumulation syndrome*. Plant Biotechnol J, 2018. **16**(9): p. 1582-1594.
246. Zhou, Y., et al., *Comparative transcriptomics provides novel insights into the mechanisms of selenium tolerance in the hyperaccumulator plant Cardamine hupingshanensis*. . Sci Reports, 2018. **8**(1): p. 2789.
247. Zeng, R., et al., *Study on differential protein expression in natural selenium-enriched and non-selenium-enriched rice based on iTRAQ quantitative proteomics*. Biomolecules, 2019. **9**(4): p. 130.
248. Karasinski, J., et al., *Allium cepa L. response to sodium selenite (Se (IV)) studied in plant roots by a LC-MS-based proteomic approach*. J Agric Food Chem, 2017. **65**(19): p. 3995-4004.
249. Wang, Y.D., X. Wang, and Y.S. Wong, *Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice*. J Proteom, 2012. **75**(6): p. 1849-1866.
250. Dimkovikj, A. and D. Van Hoewyk, *Selenite activates the alternative oxidase pathway and alters primary metabolism in Brassica napus roots: evidence of a mitochondrial stress respons*. BMC Plant Biol, 2014. **14**: p. 259.
251. Robbins, R.J., et al., *Cultivation conditions and selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate, and sulforaphane content of broccoli*. J Med Food, 2005. **8**(2): p. 204–214.
252. Schiavon, M., et al., *Selenium fertilization alters the chemical composition and antioxidant constituents of tomato (Solanum lycopersicon L.)*. J Agric Food Chem, 2013. **61**: p. 0542–10554.
253. Lazo-Vélez, M.A., et al., *Effect of germination with sodium selenite on the isoflavones and cellular antioxidant activity of soybean (Glycine max)* LWT - Food Sci Technol, 2018. **93**: p. 64-70.
254. Mahn, A., *Modelling of the effect of selenium fertilization on the content of bioactive compounds in broccoli heads*. Food Chem, 2017. **233**: p. 492-499.

255. Bernat, P., et al., *Characterisation of the wheat phospholipid fraction in the presence of nickel and/or selenium*. *Plant Growth Regul*, 2014. **72**: p. 163-170.
256. Caldana, C., et al., *High-density kinetic analysis of the metabolomic and transcriptomic response of Arabidopsis to eight environmental conditions*. *Plant J*, 2011. **67**(5): p. 869-884.
257. Lee, J., J.W. Finley, and J.M. Harnly, *Effect of selenium fertilizer on free amino acid composition of broccoli (Brassica oleracea Cv. Majestic) determined by gas chromatography with flame ionization and mass selective detection*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**: p. 9105–9111.
258. Malorgio, F., et al., *Effects of selenium addition on minimally processed leafy vegetables grown in a floating system* *J Sci Food Agric*, 2009. **89**: p. 2243–2251.
259. Labanowska, M., et al., *The effects of short-term selenium stress on Polish and Finnish wheat seedlings—EPR, enzymatic and fluorescence studies*. *J Plant Physiol*, 2012. **169**(3): p. 275-284.
260. Yanez Barrientos, E., et al., *Impact of cadmium and selenium exposure on trace elements, fatty acids and oxidative stress in Lepidium sativum* *J Mex Chem Soc*, 2012. **56**(1): p. 3-9
261. Gomez Ojeda, A., et al., *Effect of Cd(II) and Se(IV) exposure on cellular distribution of both elements and concentration levels of glyoxal and methylglyoxal in Lepidium sativum*. *Metallomics*, 2013. **5**: p. 1254-1261.
262. Torres Elguera, J., C., et al., *Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in Lepidium sativum*. *Acta Physiol Plant*, 2013. **35**: p. 431–441
263. Barickman, T.C., D.A. Kopsell, and C.E. Sams, *Selenium influences glucosinolate and isothiocyanates and increases sulfur uptake in Arabidopsis thaliana and rapid-cycling Brassica oleracea*. *J Agric Food Chem*, 2013. **61**: p. 202-209.
264. Dong, J.Z., et al., *Selenium increases chlorogenic acid, chlorophyll and carotenoids on Lycine chinense leaves*. *J Sci Food Agric*, 2013. **93**: p. 310-315.
265. Thiruvengadam, M. and I.M. Chung, *Selenium, putrescine, and cadmium influence health-promoting phytochemicals and molecular-level effects on turnip (Brassica rapa ssp. rapa)* *Food Chem*, 2015. **173**: p. 185–193.
266. Tian, M., et al., *Effect of Se treatment on glucosinolate metabolism and health-promoting compounds in the broccoli sprouts of three cultivars*. *Food Chem*, 2016. **190**: p. 374-380.
267. Zhu, Z., et al., *Selenium delays tomato fruit ripening by inhibiting ethylene biosynthesis and enhancing the antioxidant defense system*. *Food Chem*, 2017. **219**: p. 79-184.
268. Mostofa, M.G., et al., *Phenotypical, physiological and biochemical analyses provide insight into selenium-induced phytotoxicity in rice plants*. *Chemosphere*, 2017. **178**: p. 212-223.
269. Guardado-Félix, D., et al., *Effect of sodium selenite on isoflavonoid contents and antioxidant capacity of chickpea (Cicer arietinum L.) sprouts*. *Food Chem*, 2017. **226**: p. 69-74.
270. Jia, H., et al., *Low selenium increases the auxin concentration and enhances tolerance to low phosphorous stress in tobacco*. *Environ Exp Bot*, 2018. **153**: p. 127-134.
271. Jiang, L., et al., *The role of cytokinin in selenium stress response in Arabidopsis*. *Plant Sci*, 2019. **281**: p. 122-132.
272. Tamaoki, M., J.L. Freeman, and E.A.H. Pilon-Smits, *New insights into the roles of ethylene and jasmonic acid in the acquisition of selenium resistance in plants*. *PLant Signal Behav*, 2008. **3**: p. 865–867.
273. Novák, O., R. Napier, and K. Ljung, *Zooming in on plant hormone analysis: tissue-and cell-specific approaches*. *Ann Rev Plant Biol*, 2017. **68**: p. 323-348.
274. Freeman, J.L., et al., *Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in Stanleya pinnata*. *Plant Physiol Biochem*, 2010. **153**: p. 1630-1652.
275. Lehotai, N., et al., *Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during growth of Arabidopsis thaliana L.* *J Exp Bot*, 2012. **63**: p. 5677-5687.
276. Lehotai, N., et al., *Nitro-oxidative stress contributes to selenite toxicity in pea (Pisum sativum L.)*. *Plant Soil*, 2016. **400**: p. 107-122.

277. Guevara Moreno, O.D., F.J. Acevedo Aguilar, and E. Yanez Barrientos, *Selenium uptake and biotransformation and effect of selenium exposure on the essential and trace elements status: comparative evaluation of four edible plants*. J Mec Chem Soc, 2018. **62**(2): p. 247-258.
278. Zembala, M., et al., *Effect of selenium on macro and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedlings exposed to cadmium stress*. Plant Soil, 2010. **329**: p. 457–468.
279. Bai, X., et al., *Botanic metallomics of mercury and selenium: current understanding of mercury-selenium antagonism in plant with the traditional and advanced technology*. Bull Environ Contam Toxicol, 2019. **102**(5): p. 628-634.
280. Tang, W., et al., *Understanding reduced inorganic mercury accumulation in rice following selenium application: selenium application routes, speciation and doses*. Chemosphere, 2017. **169**: p. 369-376.
281. Wu, Z., et al., *Indications of selenium protection against cadmium and lead toxicity in oilseed rape (*Brassica napus* L.)*. Front Plant Sci, 2016. **7**: p. 1875.
282. Dai, J. and R.J. Mumper, *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. Molecules, 2010. **15**: p. 7313-7352.
283. Dinkova-Kostova, A.T. and R.V. Kostov, *Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease*. Trends Mol Med, 2012. **18**(6): p. 337-347.
284. Bischoff, K.L., *Glucosinolates*, in *Nutraceuticals*, R.C. Gupta, Editor. 2016, Academic Press. p. 551-554.
285. Kopsell, D.A. and W.M. Randle, *Selenium affects the S-alk(en)yl cysteine sulfoxides among short-day onion cultivars* J Am Soc Hortic Sci, 1999. **124**: p. 307–311.
286. Rothwell, J.A., et al., *Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content*. Database (oxford), 2013. **bat070**.
287. Al-Rubaye, A.F., I.H. Hameed, and M.J. Kadhim, *A review: uses of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique for analysis of bioactive natural compounds of some plants*. International Journal of Toxicological and Pharmacological Research, 2017. **9**(1): p. 81-85.
288. Sneddon, J., S. Masuram, and J.C. Richert, *Gas chromatography-mass spectrometry-basic principles, instrumentation and selected applications for detection of organic compounds*. Analytical letters, 2007. **40**(6): p. 1003-1012.
289. Mondello, L., et al., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review*. Mass spectrometry reviews, 2008. **27**(2): p. 101-124.
290. Ausloos, P., et al., *The critical evaluation of a comprehensive mass spectral library*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1999. **10**(4): p. 287-299.
291. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Analytical chemistry, 1990. **62**(19): p. 2145-2148.
292. Ouyang, G. and J. Pawliszyn, *SPME in environmental analysis*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2006. **386**(4): p. 1059-1073.
293. Souza-Silva, É.A., et al., *A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2015. **71**: p. 224-235.
294. Buchholz, K.D. and J. Pawliszyn, *Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(1): p. 160-167.
295. Silva, E.A.S., S. Risticvic, and J. Pawliszyn, *Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **43**: p. 24-36.
296. Kumar, A., et al., *A review on development of solid phase microextraction fibers by sol-gel methods and their applications*. Analytica chimica acta, 2008. **610**(1): p. 1-14.

297. Balasubramanian, S. and S. Panigrahi, *Solid-phase microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products: a review*. Food and Bioprocess Technology, 2011. **4**(1): p. 1-26.
298. Guidotti, M., G. Ravaioli, and M. Vitali, *Selective determination of Se⁴⁺ and Se⁶⁺ using SPME and GC/MS*. Journal of High Resolution Chromatography, 1999. **22**(7): p. 414-416.
299. Bidari, A., et al., *Selenium analysis in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction based on piasezenol formation and GC-ECD*. Microchimica Acta, 2008. **163**(3-4): p. 243-249.
300. Deng, C., N. Li, and X. Zhang, *Rapid determination of amino acids in neonatal blood samples based on derivatization with isobutyl chloroformate followed by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry*. Rapid communications in mass spectrometry, 2004. **18**(21): p. 2558-2564.
301. Vonderheide, A.P., M. Montes-Bayon, and J.A. Caruso, *Solid-phase microextraction as a sample preparation strategy for the analysis of seleno amino acids by gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. Analyst, 2002. **127**(1): p. 49-53.
302. Campillo, N., et al., *Headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile organic sulphur and selenium compounds in beers, wines and spirits using gas chromatography and atomic emission detection*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(39): p. 6735-6740.
303. Shah, M., J. Meija, and J.A. Caruso, *Relative mass defect filtering of high-resolution mass spectra for exploring minor selenium volatiles in selenium-enriched green onions*. Analytical chemistry, 2007. **79**(3): p. 846-853.
304. Meija, J., et al., *Simultaneous monitoring of volatile selenium and sulfur species from Se accumulating plants (wild type and genetically modified) by GC/MS and GC/ICPMS using solid-phase microextraction for sample introduction*. Analytical chemistry, 2002. **74**(22): p. 5837-5844.
305. Wierzbicka, M., *An improved method of preparing onion bulbs for the Allium test*. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 1987. **56**(1): p. 43-53.
306. Karasinski, J., et al., *Allium cepa L. response to Sodium Selenite (Se (IV)) studied in plant roots by a LC-MS-based proteomic approach*. Journal of agricultural and food chemistry, 2017. **65**(19): p. 3995-4004.
307. Swearingen Jr, J.W., et al., *Identification of biogenic dimethyl selenodisulfide in the headspace gases above genetically modified Escherichia coli*. Analytical biochemistry, 2006. **348**(1): p. 115-122.
308. Kopsell, D.A. and W.M. Randle, *Selenium affects the S-alk(en)yl cysteine sulfoxides among short-day onion cultivars*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1999. **124**(3): p. 307-311.
309. Iranshahi, M., *A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods*. Journal of essential oil research, 2012. **24**(4): p. 393-434.
310. Block, E., D. Putman, and S.H. Zhao, *Allium chemistry: GC-MS analysis of thiosulfinates and related compounds from onion, leek, scallion, shallot, chive, and Chinese chive*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. **40**(12): p. 2431-2438.
311. Gabel-Jensen, C., K. Lunøe, and B. Gammelgaard, *Formation of methylselenol, dimethylselenide and dimethyldiselenide in in vitro metabolism models determined by headspace GC-MS*. Metallomics, 2010. **2**(2): p. 167-173.
312. Matich, A.J., et al., *Organoselenides from Nicotiana tabacum genetically modified to accumulate selenium*. Phytochemistry, 2009. **70**(9): p. 1098-1106.
313. Amouroux, D., C. Pécheyran, and O.F.X. Donard, *Formation of volatile selenium species in synthetic seawater under light and dark experimental conditions*. Applied Organometallic Chemistry, 2000. **14**(5): p. 236-244.

314. Fiamegos, Y.C., C.G. Nanos, and C.D. Stalikas, *Ultrasonic-assisted derivatization reaction of amino acids prior to their determination in urine by using single-drop microextraction in conjunction with gas chromatography*. Journal of Chromatography B, 2004. **813**(1-2): p. 89-94.
315. Namera, A., et al., *Direct extract derivatization for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2002. **776**(1): p. 49-55.
316. Davis, L. and D.E. Metzler, *2 Pyridoxal-Linked Elimination and Replacement Reactions*, in *The enzymes*. 1972, Elsevier. p. 33-74.
317. Ip, C., et al., *In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention*. Cancer research, 2000. **60**(11): p. 2882-2886.
318. Husain, A., et al., *Metabolome analysis revealed increase in S-methylcysteine and phosphatidylisopropanolamine synthesis upon L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite Entamoeba histolytica*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(50): p. 39160-39170.

Cite this: *Anal. Methods*, 2017, 9, 2059

Determination of total arsenic and speciation analysis in Mexican maize tortillas by hydride generation – microwave plasma atomic emission spectrometry and high performance liquid chromatography – inductively coupled plasma – mass spectrometry

Moises Guerrero Esperanza, Eunice Yanez Barrientos, Kazimierz Wrobel, Francisco Javier Acevedo Aguilar, Alma Rosa Corrales Escobosa and Katarzyna Wrobel*

The determination of total arsenic (tAs), inorganic As (iAs = As(III) + As(V)) and As speciation in Mexican maize tortillas has been undertaken for the first time. Hydride generation – microwave plasma atomic emission spectrometry (HG-MP-AES) with tellurium (sodium tellurite Te(IV)) as the internal standard (IS) yielded tAs results in good agreement with those provided by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). In seven products from local markets, tAs was found in the range of 21.8–192 $\mu\text{g As kg}^{-1}$. Analysis of As(III), As(V), MMAs(V), and DMAs(V) by an established anion exchange liquid chromatography – ICP-MS procedure showed that iAs corresponded to 72.3–98.0% of tAs. A non-chromatographic procedure was envisioned for iAs: diluted tortilla extract or calibration solution (pH 9.0) was loaded on a strong anion exchange cartridge modified with silver chloride, iAs fraction was collected and analyzed by HG-MP-AES with IS. For tAs by HG-MP-AES (with IS) the method quantification limit was 47.6 $\mu\text{g As kg}^{-1}$ whereas for iAs it got worse (95 $\mu\text{g As kg}^{-1}$) due to the low recovery of this As form in SPE (<30%). In an attempt to eliminate matrix interference, the lower sample volume was loaded on the cartridge and ICP-MS was used for quantification, yielding an improved percentage recovery of 73.4%. On the other part, the iAs recovery was >93% while analyzing natural water with off-line quantification by any of the two atomic spectrometry techniques, indicating that the chemical matrix of tortillas was responsible for poor SPE performance. It is concluded that HG-MP-AES with IS is a cost-effective alternative for the determination of tAs that offers improved precision under a non-rigorous protocol; however, efficient separation/preconcentration of iAs by SPE is still a challenge.

Received 23rd January 2017
Accepted 28th February 2017

DOI: 10.1039/c7ay00224f

rsc.li/methods

1. Introduction

Cereal-based products constitute an important dietary source of arsenic, especially in geographical locations with naturally high element contents or in the polluted areas.¹ In this regard, element uptake, translocation, distribution and speciation in root-stem-leaf-grain have been extensively investigated in several crops such as rice, wheat and maize.^{2–9} Possible effects of grain processing on As bioavailability and its analytical speciation in food products elaborated from rice and wheat have been addressed in several studies^{10–16} whereas information on As speciation in maize-based food is scarce.^{17,18}

To prepare Mexican tortillas, raw grains need to be processed *via* nixtamalization which consists of boiling maize in lime solution for about one hour. Afterwards, the mixture is left overnight, the steeped liquor is separated, and the cooked grains are washed and ground to obtain tortilla dough.¹⁹ For massive production, commercially available maize flour is elaborated based on the above traditional procedure. It is well documented that the natural composition of maize grains in terms of fiber and micronutrient content is altered during nixtamalization^{2,20} and hence the assessment of As content/speciation in tortillas is of relevance.

Despite relatively low ionization efficiency, the monoisotopic character and polyatomic interference disturbing arsenic determination, inductively coupled plasma mass spectrometry coupled to liquid chromatography separation is a gold standard in speciation analysis of this element.^{16,21} In cereal-based food, however, the determination of arsenite (As(III)) and arsenate

Chemistry Department, Division of Natural and Exact Sciences, University of Guanajuato, L. de Retana 5, 36000 Guanajuato, Mexico. E-mail: katarzyn@ugto.mx; Tel: +52 473 7327555

(As(v)) is of special interest because these are the primary and the most toxic element forms in grains.^{2–8} Since As(III) and As(v) are readily inter-converted *in vivo* and also in the course of analytical procedure, their sum referred to as inorganic arsenic (iAs = As(III) + As(v)) has been adopted as an indicator of the health risk associated with food consumption.^{10,14,22} Non-chromatographic fractionation/separation of iAs has often been explored and in particular, solid phase extraction (SPE) seems to be an interesting option due to the large variety of sorbents available, tunable selectivity, high preconcentration factors achievable and limited use of organic solvents. Nonetheless, very few SPE procedures proved to be suitable for grain-derived food samples.^{23–25} In the application of non-chromatographic procedures, atomic fluorescence, atomic absorption or inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry is in use for As detection/quantification; to ensure sufficiently low detection limits required in food analysis and to eliminate matrix interference occurring in these techniques, arsine generation has often been integrated.^{24,26–28}

In this work, tellurium (potassium tellurite, Te(IV)) is proposed as the internal standard for the determination of total arsenic in tortillas by hydride generation – microwave plasma atomic emission spectrometry (HG-MP-AES). In particular, the hydride-forming internal standard was used to enhance the analytical performance by compensating for any imprecision associated with a non-rigorous protocol, hydride transport and for signal fluctuation inevitably occurring during instrumental measurements. The commercially available HG-MP-AES system was selected because it generates a robust nitrogen plasma of toroidal shape with nitrogen supplied *via* the in-lab air compression/filtering system, which drastically lowers the operation cost as compared to any other atomic spectrometry technique. Furthermore, as demonstrated before, sample introduction *via* hydride generation allows for the determination/speciation of hydride-forming elements at trace levels in chemically complex matrices.^{29–31} In addition to the total element, arsenic species As(III), As(v), dimethylarsinic acid (DMAs(v)), and monomethylarsonic acid (MMAs(v)) were analyzed by using an anion exchange high performance liquid chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry procedure reported previously (HPLC-ICP-MS).^{32,33} Once demonstrated that inorganic forms were predominant in tortillas, the next goal was to establish a relatively simple and cost-effective procedure by combining solid phase extraction with off-line HG-MP-AES. Disappointingly, matrix effects hindered the retention of As species on the cartridge and poor recovery of iAs was observed as compared to As(III) + As(v) results provided by HPLC-ICP-MS; however, in the analysis of a less challenging chemical matrix (natural water) iAs could be determined in the eluate by HG-MP-AES or ICP-MS with consistent results.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus

An Agilent Technologies 4100 MP-AES nitrogen microwave plasma atomic emission spectrometer controlled by Agilent MP

Expert Software (actualized from MP-AES 4200) was used with the multimode sample introduction system (MSIS).

A model 7500ce inductively coupled plasma – mass spectrometer (ICP-MS, Agilent Technologies) with a Meinhard nebulizer and Peltier-cooled spray chamber (2 °C) was used for total arsenic determination. For speciation analysis, an Agilent Series 1050 system controlled by Chemstation (Agilent Technologies) was coupled directly to an ICP-MS instrument. The analytical column Hamilton PRP-X100 (4.6 × 250 mm, 10 μm) was used with a SAX precolumn from Phenomenex. The column effluent was introduced to the ICP-MS system *via* the short-length Teflon tube and a MiraMist Teflon® nebulizer.³³

For solid phase extraction, Supelco strong anion exchange cartridges, Supel-Select SAX 200 mg/6 mL were used. A model A-30-S single piston HPLC pump was from Eldex Laboratories Inc.

2.2. Reagents and samples

All chemicals were of analytical reagent grade. Deionized water (18.2 MΩ cm, Labconco), HPLC-grade methanol and chloroform (Fisher Scientific) were used throughout.

The stock standard solutions of four arsenic species: sodium (meta) arsenite (As(III)), potassium arsenate (As(v)), dimethylarsinic acid (DMAs(v)) and disodium methylarsenate (MMAs(v)), 1000 μg As per mL each, were prepared from Sigma reagents, as described elsewhere.³³ Potassium tellurite standard solution, 1000 μg Te per mL, was prepared by dissolving an appropriate aliquot of Sigma reagent in deionized water.

The following Sigma reagents were also used: nitric acid, hydrochloric acid, acetic acid, ascorbic acid, hydrogen peroxide, ammonium nitrate, ammonium phosphate dibasic, sodium hydroxide, Tris/HCl, silver nitrate, potassium iodide, and sodium chloride.

An Agilent Technologies mixed internal standard solution was also used (In, Y, Bi, Rh, 2 mg L⁻¹; Li, 10 mg L⁻¹; Sc, 5 mg L⁻¹).

Maize tortillas (T1–T7) were purchased during summer 2015 at seven randomly selected markets in Guanajuato city and its vicinity (Guanajuato State, Mexico). Prior to the storage, about 100 g aliquots were homogenized (Polythron) and freeze-dried. For comparative purposes, a sample of air-dried and ground rice was also included (R1). Three natural water samples (W1–W3) were collected at different sampling sites from Presa Purisima, a dam located in the vicinity of Guanajuato city; the samples were filtered on-site (Whatman, 0.22 μm), acidified (5 mmol L⁻¹ nitric acid) and stored at 4 °C in the dark.

2.3. Determination of total arsenic by ICP-MS

Three sub-samples of each freeze-dried tortilla sample or rice powder were analyzed; 0.2 g aliquot was placed in a glass tube, 250 μL of ICP-MS internal standard mix and 1 mL of concentrated nitric acid were added, the sample was heated at 80 °C for 5 min, then at 120 °C for 3 h and was left for 1 h to cool down. Finally, 1 mL of hydrogen peroxide (30% v/v) was added and after 30 min, 225 μL were withdrawn and diluted to 5 mL with deionized water. The samples were centrifuged (10 000g, 15 min) prior to their introduction to the ICP-MS system. Blank was always run in parallel. Water samples were analyzed

directly, after IS addition. The instrumental operating conditions were as follows: forward power 1500 W, plasma gas flow rate 15 L min⁻¹, carrier gas flow rate 0.89 L min⁻¹, make-up gas flow rate 0.10 L min⁻¹, sampling depth 8 mm, platinum sampling and skimmer cones, dwell time 100 ms per isotope, and collision/reaction cell gas He, 4.5 mL min⁻¹. Five points external calibration was performed at element concentration levels of 0–100 µg As L⁻¹ with the addition of the internal standard (10 µg Rh per L). The linear regression functions were obtained ($r^2 > 0.999$) and the evaluated instrumental detection limit for ⁷⁵As was 12 µg As L⁻¹. The analytical accuracy was demonstrated by analyzing the reference material NIST 1643d (mean ± SD: 54.9 ± 1.3 µg As L⁻¹; certified value: 56.0 ± 0.7 µg As L⁻¹).

Total As was also determined in lipid fraction; for this purpose 1 g of freeze-dried tortilla was extracted with 4 mL of chloroform : methanol (3 : 5) in an ultrasonic bath. Afterwards, 2.5 mL of deionized water were added, the mixture was centrifuged, and the organic phase was recovered and evaporated. The internal standard mix was added to the residue together with 500 µL of concentrated nitric acid (110 °C, 3 h) and after appropriate dilution of the digested sample, it was introduced to ICP-MS.

2.4. Speciation analysis by HPLC-ICP-MS

For extraction, 0.2 g aliquot of the freeze-dried tortilla or rice powder was weighed in a 2 mL eppendorf tube and 1.5 mL of nitric acid 2.5% v/v were added; the mixture was vortexed and heated at 90 °C for 1.5 h.^{15,34,35} Once centrifuged (10 000g, 15 min), 500 µL of the supernatant were taken to a new tube, 20 µL of ammonium hydroxide 28% v/v were added and the sample was evaporated (60 °C, 100 min, SpeedVac). The residue was reconstituted by adding 200 µL of mobile phase, 250 µL of deionized water, 200 µL of methanol and 500 µL of chloroform. The sample was vortexed, centrifuged (10 000g, 15 min) and, 200 µL of water : methanol phase were mixed with 400 µL of mobile phase. Three replicates were carried out per tortilla sample and blank was included. The chromatographic separation was carried out as described elsewhere with slight modifications.^{32,33} In brief, the mobile phase is composed of ammonium phosphate dibasic 10 mmol per L and ammonium nitrate 10 mmol per L (pH 5.7) was used at a flow rate of 1.1 mL min⁻¹; the column was kept at room temperature and the injection volume was 100 µL. These same ICP-MS operating conditions were used for total As analysis except for a carrier gas flow rate of 0.80 L min⁻¹ and a time-resolved acquisition mode with a dwell time of 200 ms. External calibration was performed with a series of standard solutions containing As(III), As(V), MMAs(V) and DMAs(V) (0; 2.5; 5.0; 7.5; 10; 50 µg As L⁻¹ each). The peak area was used as the analytical signal mode and linear regression functions always presented $r^2 > 0.9997$; the instrumental quantification limits for these four species were 0.56 µg As L⁻¹, 0.72 µg As L⁻¹, 0.64 µg As L⁻¹, and 0.39 µg As L⁻¹, respectively. For recovery experiments, 30 µL of the standard mix at concentration 200 µg As L⁻¹ were added to the freeze dried material, which corresponded to 1 µg As L⁻¹ in the final sample solution injected on-column.

2.5. Determination of total arsenic by HG-MP-AES

Similar to ICP-MS, three aliquots per sample were acid digested; in this case however 500 mg of freeze-dried tortilla or rice powder were taken, internal standard (40 µL potassium tellurite 25 mg Te per L) and 2 mL of concentrated nitric acid were added, and the samples were heated at 80 °C for 5 min followed by 120 °C for 3 h. Once centrifuged, 1.6 mL were withdrawn, diluted to 3 mL with deionized water and the reduction mixture was added (550 µL of potassium iodide 36% m/v + ascorbic acid 3.6% m/v and 1.45 mL of HCl 12 mol L⁻¹). For the analysis of natural water, 3 mL were taken, IS and pre-reduction solution was added. Calibration solutions contained 0, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 µg As L⁻¹ (As(V)), Te(IV) 150 µg Te per L and pre-reduction mixture (final volume 5 mL). The prepared solutions were submitted to HG-MP-AES. Using a multimode sample introduction system, the sample/standard was pumped through the lower channel, the reducing agent through the upper channel and nebulization gas was introduced perpendicularly.²⁹ For acidification, HCl 8 mol L⁻¹ was introduced to the sample flow through T-connection. The hydride generation and instrument operating conditions are listed in Table 1. It is noteworthy that higher than usual sodium borohydride concentration (2% m/v) was necessary while using the MP-AES multimode sample introduction system.²⁹ For the recovery experiment, the T1 sample was used, 100 ng of arsenic (100 µL of As(V) 1.0 mg As L⁻¹) were added prior to digestion which corresponded to 200 µg As kg⁻¹ spike in the freeze dried tortilla and to 16 µg As L⁻¹ in the solution submitted to HG-MP-AES. Three independent replicates were carried out in this experiment.

2.6. Solid phase extraction of iAs

Supel-Select SAX cartridges were modified as reported by Issa *et al.*³⁶ with slight modifications. With the aid of a single piston Eldex HPLC pump, 20 mL of nitric acid 0.1% v/v (16 mmol L⁻¹) and 20 mL of deionized water were passed through a new cartridge at a flow rate of 1 mL min⁻¹, this was followed by 20 mL of sodium chloride 1 mol L⁻¹, 20 mL of silver nitrate 50 mmol L⁻¹ and 15 mL of hydrochloric acid 0.1% v/v (28 mmol L⁻¹). Finally, the cartridge was washed with 20 mL of deionized water and pre-conditioned with 20 mL of Trizma base 100 mmol L⁻¹ (pH 10.1). Such a prepared cartridge could be used for about 20 cycles.

Three portions of each freeze-dried material (2 g) were placed in the glass tubes and 20 mL of nitric acid 0.06 mol L⁻¹ were added. The samples were heated at 95 °C for 90 min centrifuged (3000g, 1 h) and the supernatant was used for further analysis.^{23,37}

For HG-MP-AES, 10 mL of tortilla extract was diluted to 30 mL with Trizma base 100 mmol L⁻¹ (pH 10.1) and loaded on the modified cartridge (conditions A); 10 mL of natural water was diluted to 30 mL with Trizma 10 mmol L⁻¹ solution, pH 9.5 (conditions B). Calibration was carried out by loading 30 mL aliquots of As(V) solutions that contained 0, 10, 20, 40, 60, and 80 µg As L⁻¹ and this same concentration of Trizma base as used for the samples. In the next step, 3 mL of acetic acid 35 mmol L⁻¹ were passed to eliminate organic As species and then, the iAs fraction was eluted with 3 mL of nitric acid 16 mmol L⁻¹, the flow rate of 1 mL min⁻¹ was always used. Total arsenic in the

Table 1 Instrumental operating conditions of the HG-MP-AES system

Hydride generation	
Acidification ^a	HCl 8 mol L ⁻¹ , 1 mL min ⁻¹
Hydride generation ^a	NaBH ₄ 2% m/v + NaOH 0.3% m/v, 1 mL min ⁻¹
MP-AES detection	
Nitrogen pressure	140 psi
EGCM ^b	Medium
Nebulizer/spray chamber	MiraMist Teflon®/multimode sample introduction system
Nebulizer pressure	240 kPa
Viewing position	-20
Acquisition mode	Continuum
Integration time	3 s
Detection wavelength	193.695 nm, 228.812 nm (As), 214.281 nm (Te)
Background correction	Off-peak left + right
Number of pixels	3

^a These solutions were carried using the MP-AES peristaltic pump.

^b External gas control module for air injection.

collected eluate (iAs) was determined following the HG-MP-AES procedure with IS, described above.

For ICP-MS determination, 1 mL of tortilla extract or 5 mL of natural water were diluted to 30 mL with Trizma base 10 mmol L⁻¹, pH 9.5, and submitted to SPE (conditions C). The internal standard was added to the collected iAs fraction (50 µL, 1.0 mg Rh per L), the volume was brought to 5 mL and introduced to ICP-MS. Calibration was carried out using 30 mL aliquots of As(v) solutions that contained 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, and 10 µg As L⁻¹ in the Trizma base.

For recovery experiments, 1 µg of arsenic were added to 2 g aliquot of the freeze-dried tortilla or to 5 mL of natural water (100 µL of As(v) 10 mg As L⁻¹) that would correspond to 10 µg As L⁻¹ in the solution submitted to ICP-MS. When HG-MP-AES was to be used, this same amount of As(v) standard was added to the sample before SPE, yielding 100 µg As L⁻¹ in the final solution.

3. Results and discussion

Maize is the main crop cultivated in Mexico and maize tortillas are a staple food in this country.^{2,5} In several locations, including Guanajuato, elevated concentrations of arsenic were found in soils, ground water³² and also in the maize plant,^{4,5} calling for the evaluation of tortillas as a possible dietary source of As. In this regard, the capability of HG-MP-AES for total and inorganic arsenic determination in tortillas has been explored in this work and ICP-MS was used for comparative purposes. In addition to tAs determination, four species usually reported in vegetables and vegetable-based foodstuff were determined by anion exchange HPLC-ICP-MS.

3.1. Te(IV) as internal standard for arsenic determination by hydride generation – MP-AES

Tellurium is one of the hydride-forming elements; its concentration in the earth's crust is low (5 µg Te per kg) and the

concentrations reported in grain crops were also low (0.75–2.4 µg Te per kg).³⁸ In this work, Te(IV) in form of potassium tellurite was examined as a possible internal standard for the determination of arsenic by hydride generation (HG)-MP-AES. To demonstrate the feasibility of Te determination by HG-MP-AES under these same instrument operation conditions as applied for As (Table 1), the calibration process was carried out covering the concentration range 0–300 µg Te per L. The linear regression function presented $r^2 > 0.999$ and the evaluated instrumental detection limit was 3.4 µg Te per L. The T1–T7 and R1 digests were analyzed for total Te, this element was not detected in any sample allowing for its use as IS.

Te(IV) was added to all As(v) calibration solutions and in Fig. 1, the obtained emission signals for arsenic (193.695 nm, 228.812 nm) and for tellurium (214.281 nm) are presented; the emission line 228.812 nm was selected for As determination. In

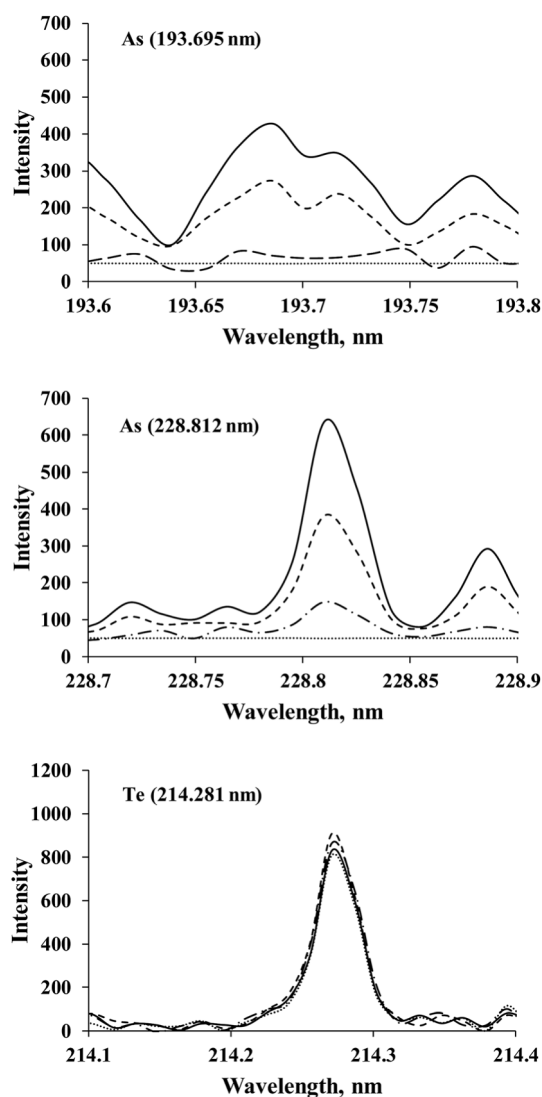


Fig. 1 Analytical signals obtained for calibration solutions containing (····) 0, (– · –) 10, (– – –) 30, (–) 50 µg As L⁻¹ as As(v) and 150 µg Te per L as Te(IV) by hydride generation – MP-AES. (a) As at wavelength 193.695 nm. (b) As at wavelength 228.812 nm. (c) Te at wavelength 214.281 nm.

Table 2 Typical analytical parameters evaluated for tAs determination by hydride generation – microwave plasma – atomic emission spectrometry (HG-MP-AES). The limits of detection and quantification were evaluated according^a to the ICH Harmonized Guideline³⁹

Parameter	HG-MP-AES	
	With IS	Without IS
Calibration range, $\mu\text{g As L}^{-1}$	0; 10; 20; 40; 60; 80; 100	0; 10; 20; 40; 60; 80; 100
Linear regression function	$S_{\text{As}}/S_{\text{Te}} = (3.362c + 2.04) \times 10^{-2}$	$S_{\text{As}} = 11.204c + 10.62$
Standard error for slope	3.75×10^{-4}	0.298
Standard error for intercept	6.43×10^{-3}	9.04
r^2	0.9996	0.9973
Instrumental DL, $\mu\text{g As L}^{-1}$	1.5	2.0
Instrumental QL, $\mu\text{g As L}^{-1}$	5.0	6.7
CV, %	0.9	1.5
Method QL, $\mu\text{g As kg}^{-1}$ (freeze-dried tortilla)	47.6	64.5
Method QL, $\mu\text{g As L}^{-1}$ (natural water)	8.3	11.2

^a S_{As} , S_{Te} – signal intensity measured as the peak area for As at 228.812 nm and for Te at 214.281 nm, respectively; c – As(v) concentration, $\mu\text{g As L}^{-1}$; IS – internal standard; DL, QL – instrumental detection and quantification limits evaluated based on the calibration process; methods DL and QL for tortillas were evaluated using the 5-fold diluted T4 sample and for natural water 10-fold diluted W3 sample was used; CV – coefficient of variance evaluated for five successive replicates of As(v) standard $20 \mu\text{g As L}^{-1}$.

Table 2, typical analytical parameters evaluated based on linear regression calibration with and without IS are presented. It is of note that the application of IS enabled better linear fit of calibration function (r^2 , standard error for slope and for intercept), better precision (CV) and lower detection/quantification limits than those obtained without IS. The quantification limit of the method for tortillas was evaluated based on the calibration performed in the presence of the sample matrix (5-fold diluted extract of T4 containing $21.8 \pm 0.7 \mu\text{g As kg}^{-1}$ as determined by ICP-MS); for natural water, the method detection limit was evaluated using the 10-fold diluted W3 sample.³⁹

For accuracy testing of the HG-MP-AES procedure with IS, As(v) was added to the T1 sample prior to its digestion as described in Section 2.5. In three independent replicates, the results obtained were as follows: $190 \pm 9 \mu\text{g As kg}^{-1}$ in the non-

spiked sample and $392 \pm 15 \mu\text{g As kg}^{-1}$ after standard addition. The obtained average percentage recovery of 101% (individual results 94.0%, 107%, and 102%) is indicative of acceptable accuracy.

The results presented in Table 2 and those obtained in the recovery experiment clearly demonstrate the benefits of Te(IV) as IS in the determination of tAs by HG-MP-AES. Firstly, the improvement of analytical parameters evaluated in the calibration process (Table 2) confirms that the normalization of the As signal by that of IS provided compensation of fluctuations inevitably occurring during the transport of hydrides to the plasma and during the MP-AES instrumental measurement. Furthermore, for tAs determination in tortillas, Te(IV) was added prior to acid digestion, enabling to adopt a non-rigorous protocol without the necessity for precise measurement/adjustment of sample/reagent volumes (Section 2.5), similarly as practiced in other instrumental techniques.^{40,41} Importantly, even under imprecise volume management during sample treatment, tAs recovery close to 100% was obtained and relative standard deviation for three replicates of this same sample did not exceed 8% (Table 3).

Table 3 Concentrations of tAs found in real-world samples by the proposed HG-MP-AES procedure and by ICP-MS. (Values are mean \pm SD for three replicates; for tortillas (T1–T7) and for rice (R1) the concentrations are $\mu\text{g As kg}^{-1}$ and for water samples $\mu\text{g As L}^{-1}$)^a

Sample	tAs \pm SD	
	HG-MP-AES ^(a)	ICP-MS ^(b)
T1	190 ± 9	192 ± 4
T2	<LQ	44.1 ± 4.2
T3	56.2 ± 3.1	52.0 ± 0.4
T4	<LQ	21.8 ± 0.7
T5*	88.0 ± 1.2	85.4 ± 0.8
T6	<LQ	38.4 ± 0.7
T7	48.7 ± 3.5	50.1 ± 0.8
R1	118 ± 5	120 ± 7
W1	20.4 ± 1.2	21.9 ± 0.6
W2	23.3 ± 1.7	24.3 ± 0.5
W3	20.9 ± 1.5	19.3 ± 0.8

^a (a) – Internal standard Te, $\lambda = 214.218 \text{ nm}$; (b) – internal standard Rh, $m/z 103$; * – Statistical comparison of means indicated difference at $p < 0.05$.

3.2. Results of tAs determination

Seven tortilla samples (T1–T7), one rice (R1) and three water samples (W1–W3) were analyzed by using the proposed HG-MP-AES procedure and by ICP-MS. The results obtained are presented in Table 3; it can be observed that ICP-MS provided quantitative results in all analyzed samples with the concentration in the freeze dried tortillas ranging from $21.8 \mu\text{g As kg}^{-1}$ to $192 \mu\text{g As kg}^{-1}$. On the other part, the capability of HG-MP-AES afforded tAs determination in four tortilla samples (48.7 – $190 \mu\text{g As kg}^{-1}$), in rice and in water samples. The results for the two procedures were in good agreement as indicated by statistical comparison of means (Statistica for Windows, StatSoft Inc.); at significance level $p < 0.05$, difference was found only for one sample (Table 3). Nonetheless, HG-MP-AES presented

clearly poorer detection power than ICP-MS; method quantification limit for the freeze-dried tortilla was $47.6 \mu\text{g As kg}^{-1}$ for HG-MP-AES against $9.9 \mu\text{g As kg}^{-1}$ for ICP-MS.

It should be stressed that our results corresponded to the lower edge of values reported previously in tortillas from arsenic-affected endemic area in Mexico (Region Lagunera, $50\text{--}1130 \mu\text{g As kg}^{-1}$)⁴² though were slightly higher than those found for corn flour from Turkish markets ($2.02\text{--}51.9 \mu\text{g As kg}^{-1}$)⁴³ or in corn cereals from Spain (from not detected to $10.5 \mu\text{g As kg}^{-1}$).⁴⁴ Rice and water samples were analyzed only for comparative purposes yet it is noted that the obtained results were consistent with data obtained for US-produced rice⁴⁵ and with existing data on As content in Presa Purisima (K. Wrobel, unpublished results), respectively.

3.3. Quantitative evaluation of total As, As(III), As(V), MMAs(V) and DMAs(V) in tortillas

For speciation analysis, extraction was carried out with diluted nitric acid.^{15,34,35} The obtained extracts were submitted to an anion exchange HPLC-ICP-MS procedure.^{32,33} In the preliminary experiments, separation of As species was not achieved, therefore a clean-up step was included to eliminate lipids potentially deteriorating the chromatographic process (about 2 g per 100 g of tortilla⁴⁶). In particular, nitric acid extracts were vortexed with the

chloroform-methanol mixture as described in Section 2.4 and the organic phase was discarded; doing so, the baseline separation of four As species was attained. It is noteworthy that arsenic was not detected in the lipid fraction of any sample, so the obtained speciation results are representative for total As contents in tortillas. In Fig. 2, chromatograms obtained for T1 and T2 samples are presented as an example; chromatograms obtained after the addition of the standard mix are also included (detailed description is given in Section 2.4). Quantification results for all tortilla (T1–T7), R1 and W1 samples are presented in Table 4. The percentage recoveries evaluated for T1–T7 after one-point standard addition (see Section 2.4), were as follows: 84.4–107% As(III), 95.9–115% DMAs(V), 91.3–99.6% MMAs(V), 79–95.4% As(V). Standard addition to the rice R1 yielded recoveries of 82.9%, 101%, 98.4% and 81.4%, respectively. The sum of individual species determined in each sample was divided by tAs assessed directly in acid digests; the percentage values were in the range of 87.7–119% indicating acceptable element recovery in the speciation procedure (Table 4).

Most importantly, As(III) and As(V) were two predominant species; in seven tortilla samples, their relative content was found in the range of 30.8–78.1% and 9.8–62.6%, respectively, as compared to the sum of species determined in each sample by HPLC-ICP-MS. Taking the sum of As(III) and As(V), 72.3–98.0% As in tortillas was present as iAs (Tables 3 and 4). The residual arsenic was found as DMAs(V) (2.1–27.7% with respect to the sum of all species) whereas MMAs(V) was not detected in any sample. To the best of our knowledge, this is the first report on As speciation in maize tortillas, so the results obtained can be compared only with data available for grain. Indeed, various studies confirmed the prevalence of inorganic species in all parts of the maize plant.^{4,5} In particular, it was proposed that phosphate transporters are responsible for preferential As(V) uptake in roots and then, the reduction to As(III) occurs as a result of the plant's anti-oxidative response.⁴⁷ It has also been suggested that methylated arsenic species can be adsorbed from soil or might be formed due to microbial activity during plant growth or post-harvest, yet the maize plant itself does not seem to be capable for biomethylation of iAs.^{5,48} Similar to the concentrations of iAs reported in the maize grain in other studies, the values ranged from non-detected in low-As environments up to $0.7 \text{ mg As kg}^{-1}$ in high-As locations.^{5,49}

In the rice sample DMAs(V) accounted for 70.6% and iAs only for 29.4% of tAs (Table 2); our results supported those reported for US-produced rice.⁴⁵ As could be expected, the primary species in the water sample corresponded to As(V).

Inorganic arsenic was found as a major element form in seven tortilla samples, indicating the need for further studies evaluating this Mexican staple food as a potential dietary source of iAs. The analytical procedure to be used for such a purpose should be relatively simple, cost-effective and well suited for routine analysis of large series of samples.

3.4. Separation/preconcentration of iAs by solid phase extraction

In the first approach, iAs retention was intended using a strong anion exchange cartridge, as described elsewhere³⁷ but the

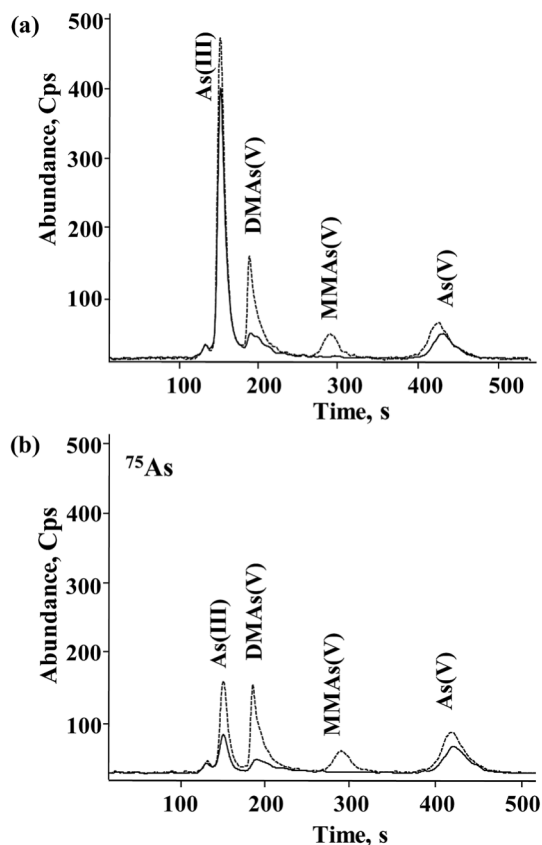


Fig. 2 HPLC – ICP-MS chromatograms of tortilla extracts (—) and these same samples after standard addition (---). (Mixed standard was added to the freeze-dried sample to obtain $1 \mu\text{g As L}^{-1}$ of each species in the final solution): (a) T1. (b) T2.

Table 4 HPLC-ICP-MS determination of four element species and percentage recoveries obtained in the speciation analysis of tortilla (T1–T7), rice (R1) and water (W1) samples. (Values are mean \pm SD for three replicates; for tortillas (T1–T7) and for rice (R1) the concentrations are $\mu\text{g As kg}^{-1}$ and for the water sample $\mu\text{g As L}^{-1}$)

	As(III)	DMAs(v)	MMAs(v)	As(v)	Σ species	iAs	iAs ^a , %	R ^b , %
T1	154 \pm 9	4.2 \pm 0.2	Nd	41.1 \pm 1.2	199	195	98.0	104
T2	30.7 \pm 1.6	4.0 \pm 0.2	Nd	4.6 \pm 0.3	39.3	35.3	89.8	89.1
T3	24.3 \pm 0.8	7.5 \pm 0.4	Nd	19.7 \pm 0.8	51.5	44.0	85.4	99.0
T4	8.0 \pm 0.5	7.2 \pm 0.2	Nd	10.8 \pm 0.6	26.0	18.8	72.3	119
T5	25.8 \pm 0.7	4.9 \pm 0.3	Nd	51.3 \pm 1.1	82.0	77.1	94.0	96.0
T6	23.3 \pm 0.7	7.1 \pm 0.4	Nd	8.0 \pm 0.4	38.4	31.3	81.5	100
T7	32.6 \pm 0.8	7.0 \pm 0.5	Nd	4.3 \pm 0.2	43.9	36.0	82.0	87.6
R1	15.6 \pm 0.3	90.7 \pm 1.5	Nd	22.0 \pm 1.0	128	37.6	29.4	107
W1	nd	1.9 \pm 0.3	Nd	19.2 \pm 0.8	21.1	19.2	91.0	96.3

^a Percentage of iAs = iAs/ Σ species. ^b R = (Σ species/tAs) \times 100, tAs presented in Table 3; nd – not detected, <DL.

retention of As(III) and As(v) was very poor under our conditions. Issa *et al.*³⁶ designed a silver loaded strong anion exchange resin to separate inorganic As species from MMAs(v) and DMAs(v). Using a fixed bed flow system, the binding capacity of this resin for inorganic species was found to be the best at pH 9 (80 $\mu\text{g As per g}$ for As(v) and 85 $\mu\text{g As per g}$ for As(III)) whereas two organic species did not present any retention at this pH; the resin was also described as stable and efficient in the application to natural water samples.³⁶ In the present work, strong anion exchange cartridges, Supel-Select SAX 200 mg/6 mL, were modified as described in the cited work. It is noteworthy that the highest concentration of tAs found in tortillas was about 200 $\mu\text{g As kg}^{-1}$ (Table 3) and even if it corresponded exclusively to iAs, the reported binding capacity should enable loading up to 80 g tortilla without element loss.

The retention behavior of As(III), As(v), MMAs(v) and DMAs(v) was examined by loading a 5 mL aliquot of individual standard solutions (100 $\mu\text{g As L}^{-1}$ each) prepared in 0.06 mol L⁻¹ nitric acid with addition of Trizma base 100 mmol L⁻¹ (pH 10.1). Nitric acid was necessary to simulate the acidity of tortilla/rice extracts and 100 mmol L⁻¹ concentration of Trizma base was selected to ensure pH 9 required for the retention of As species during SPE. The cartridge eluates were analyzed for not-retained As by HG-MP-AES with IS. Using the flow rate range of 1–5 mL min⁻¹, the results obtained confirmed the trapping of As(III), As(v) and no interaction for DMAs(v); however, MMAs(v) was retained on the cartridge. Since ion exchange and chemisorption processes were considered to be involved in retention,³⁶ the observed effect can be explained in terms of higher affinity of doubly charged MMAs(v) (pK_{a1} = 4.1, pK_{a2} = 8.7) to the SAX-AgCl resin with respect to DMAs(v) which has only one charge (pK_a = 6.2) and contains two methyl groups as a steric impediment.

Arsenic elution from the cartridge was studied using acetic acid in the pH range of 2.6–4.0 for MMAs(v) and diluted nitric acid at pH < 2 for iAs (As(III) + As(v)). Based on several experiments carried out by varying pH, volumes and flow rates, the finally selected parameters were as follows: 3 mL of acetic acid at pH 2.6 for MMAs(v) elution followed by 3 mL of nitric acid at pH 1.6 (0.1% HNO₃ m/v) for iAs, both eluents at the flow rate of 1 mL min⁻¹. To further examine the analytical performance of solid phase

extraction, 5 mL aliquots of two As(v) acidified standard solutions (10, 50 $\mu\text{g As L}^{-1}$) with addition of MMAs(v), DMAs(v) (100 $\mu\text{g As L}^{-1}$ each) and Trizma base 100 mmol L⁻¹ were submitted to SPE and As was determined in the collected iAs fraction by HG-MP-AES with IS. Poor retention of iAs was observed in this experiment; the signal for 10 $\mu\text{g As L}^{-1}$ was hardly detected although for direct HG-MP-AES measurements, the instrumental detection limit was 1.5 $\mu\text{g As L}^{-1}$. When a standard solution containing 50 $\mu\text{g As L}^{-1}$ as As(v) was loaded on the cartridge, the recovery of iAs was 36.4%. On the other part, almost complete recoveries (>93%) were obtained for two above As solutions while loading non-acidified standards that required ten times lower Trizma base concentration to maintain pH 9. The obtained results indicate that elevated ionic strength was unfavorable for iAs retention, in agreement with the previous report.³⁷ Different solutions were then examined with the aim to lower the total salt concentration while maintaining pH 9 required for iAs trapping. In particular, phosphate, borate and carbonate buffers were tested, each of them in the concentration range of 10–100 mmol L⁻¹ but still, the best iAs recovery from the cartridge was observed using the Trizma base for pH adjustment. Using these conditions, separation performance of the cartridge remained unchanged for at least 20 cycles, with the coefficient of variance of 5.2% evaluated for five non-successive replicates of 100 $\mu\text{g As L}^{-1}$ (in form of As(v)). To examine the possibility of As(v) preconcentration from acidified solutions containing the Trizma base 100 mmol L⁻¹, different volumes were loaded on the SAX-AgCl cartridge, all of them containing 500 ng of As as As(v), with addition of 150 ng of As in the form of DMAs(v) and in the form of MMAs(v). The recoveries of iAs in nitric acid SPE fraction were 34.1%, 37.7%, 32.5%, 37.3%, and 39.6% for the volumes 5 mL, 8 mL, 15 mL, 25 mL and 50 mL, respectively, these relatively constant values suggest the feasibility of preconcentration. The volume to be loaded on the cartridge was set as 30 mL and calibration was carried out, as described in the Materials and methods section (Section 2.6). Typical analytical parameters of SPE – HG-MP-AES are summarized in Table 5; even though the volume of calibration solutions was 6 times reduced during SPE (30 mL recovered in 3 mL of iAs fraction + 2 mL pre-reduction mix), due to the poor retention efficiency the enrichment factor of about 2 was achieved.

Table 5 Typical analytical parameters evaluated for iAs determination by off-line SPE followed by HG-MP-AES with IS or ICP-MS and the results obtained for tortilla (T1) and water (W1) samples. (Details of sample treatment, conditions A, B, C and standard addition are given in Section 2.6. The limits of detection and quantification are evaluated according to the ICH Harmonized Guideline³⁹)

Parameter	SPE – HG-MP-AES	SPE – ICP-MS
Calibration range, $\mu\text{g As L}^{-1}$	0; 10; 20; 40; 80 ^(A)	0; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0; 10 ^(C)
Linear regression function	$S_{As}/S_{Te} = (6.480c - 5.17) \times 10^{-2}$	$S_{As}/S_{Rh} = (7.312c + 0.16) \times 10^{-3}$
Standard error for slope	2.15×10^{-3}	1.76×10^{-4}
Standard error for intercept	4.36×10^{-2}	0.24×10^{-3}
r^2	0.9897	0.9957
Instrumental DL, $\mu\text{g As L}^{-1}$	0.9	0.012
Instrumental QL, $\mu\text{g As L}^{-1}$	3.1	0.042
CV, % ^(*)	6.2	3.4
Method QL (tortilla), $\mu\text{g As kg}^{-1}$	95 ^(A)	12.6 ^(C)
Method QL (water), $\mu\text{g As L}^{-1}$	11.2 ^(B)	0.28 ^(C)
T1, mean \pm SD, $\mu\text{g As kg}^{-1}$	<LQ ^(A)	139 ± 12 ^(C)
Recovery T1, % ^(**)	28.7 ^(A)	73.4 ^(C)
W1, mean \pm SD, $\mu\text{g As L}^{-1}$	16.8 ± 1.9 ^(B)	17.7 ± 1.2 ^(C)
Recovery W1, % ^(**)	93.2 ^(B)	97.8 ^(C)

^a (A) – Conditions A; (B) – conditions B; (C) conditions C; (*) – coefficient of variance evaluated for five successive replicates of the lowest calibration standard; (**) – $1.0 \mu\text{g As (As(v))}$ added to the sample as described in Section 2.6; c – concentration of As(v) as $\mu\text{g As L}^{-1}$; instrumental DL, QL – evaluated based on calibration process; method DL, QL – evaluated for 5-fold diluted extract of tortilla T4 and for 10-fold diluted water W3 sample, respectively.

3.5. Application of solid phase extraction for the analysis of real-world samples

As presented in Table 4, T1 contained the highest tAs and iAs concentrations therefore this sample was used to examine the feasibility of SPE for iAs determination in maize tortillas; 10 mL was the maximum volume of extract that could be adjusted with Trizma base 100 mmol L^{-1} to pH 9 while maintaining the final volume of 30 mL (conditions A, Section 2.6). The obtained results are presented in Table 5 and it can be observed that the iAs concentration in T1 was below the quantification limit of the off line SPE – HG-MP-AES and after standard addition ($1.0 \mu\text{g As as As(v)}$), the percentage recovery in this procedure was unsatisfactory (28.7%). It is perceived that not only the high salt concentration but also the tortilla's chemical composition had a deteriorating effect on iAs retention. To prove this hypothesis, ICP-MS was used for As quantification. Owing to a better detection power of this technique as compared to HG-MP-AES, 1 mL of tortilla extract was taken and pH 9 was obtained using 10 mmol L^{-1} Trizma base (conditions C, Section 2.6). Analytical features for the off-line SPE – ICP-MS are presented in Table 5 together with the results obtained for the T1 extract. As expected, using a lower amount of extract and ten times lower concentration of buffer (conditions C), the results were clearly improved yet iAs recovery was still below 75%. To demonstrate that the sample matrix was responsible for poor performance of SPE, the analysis of a less challenging chemical system, natural water (W1), was carried out. As described in Section 2.6 (conditions B and C), the calibration solutions and the sample contained the Trizma base at a concentration of 10 mmol L^{-1} . The results obtained for the W1 sample are presented in Table 5; no statistical difference ($p < 0.05$) was found in the comparison of means for iAs determined by HG-MP-AES with IS ($16.8 \pm 1.9 \mu\text{g As L}^{-1}$) or ICP-MS ($17.7 \pm 1.2 \mu\text{g As L}^{-1}$) and iAs

concentration provided by the HPLC-ICP-MS procedure ($19.2 \pm 0.8 \mu\text{g As L}^{-1}$, Table 4). In the method of standard addition, the two techniques provided recoveries of 93.2% and 97.8%, respectively (Table 5).

4. Conclusions

In this work, arsenic determination and speciation in maize tortillas were carried out. For tAs, hydride generation – MP-AES was applied and hydride-forming tellurium (Te(IV)) was introduced as the internal standard. Since IS was added prior to sample digestion, a non-rigorous measurement/adjustment of volumes during sample treatment was possible without affecting the analytical results. Furthermore, IS compensated for imprecisions associated with sample introduction and for signal fluctuation during instrumental measurements, yielding enhanced analytical performance in terms of better precision and lower detection limit as compared to this same procedure without IS. The results for tAs obtained by HG-MP-AES with IS and by ICP-MS were in good agreement; however, the method quantification limit of the proposed procedure ($47.6 \mu\text{g As kg}^{-1}$) was a restraining factor. The concentration of tAs was in the range $21.8\text{--}192 \mu\text{g As kg}^{-1}$ and iAs corresponded to 72.3–98.0% of tAs, as found by HPLC-ICP-MS, indicating the need for further studies of tortillas as a potential dietary source of iAs. Within this context, solid phase extraction using strong anion exchange phase modified with silver chloride was tested for separation/preconcentration of iAs, followed by off-line HG-MP-AES or ICP-MS. Poor recovery of iAs observed while analyzing tortilla extracts by SPE with HG-MP-AES (below 30%) was ascribed to relatively high total salt content and chemically complex composition of the sample loaded on the cartridge that hindered iAs retention. Indeed, iAs recovery increased (73.4%)

while lowering the amount of sample and concentration of buffering solution; however, the detection power of ICP-MS was then needed. Of note, satisfactory results obtained for iAs in chemically less complex natural water by SPE with any of two atomic spectrometry techniques served as an additional proof that the matrix composition of tortillas was responsible for poor analytical performance. Very few studies have made use of SPE for the determination of iAs in grain-related products so far, and our results might be helpful in future development; especially because SPE offers several advantages in terms of simplicity of operation, low requirement for reagents/solvents, low cost and high throughput.

Acknowledgements

The financial support from the National Council of Science and Technology, Mexico (CONACYT), project 178553, is gratefully acknowledged.

References

- 1 European Food Safety Authority, *EFSA J.*, 2014, **12**, 1–68.
- 2 E. T. Nuss and S. A. Tanumihardjo, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2010, **9**, 417–436.
- 3 A. M. Carey, E. Lombi, E. Donner, M. D. de Jonge, T. Punshon, B. P. Jackson, M. L. Guerinot, A. H. Price and A. A. Meharg, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 3275–3286.
- 4 J. M. Rosas-Castor, J. L. Guzmán-Mar, J. M. Alfaro-Barbosa, A. Hernández-Ramírez, I. N. Pérez-Maldonado, A. Caballero-Quintero and L. Hinojosa-Reyes, *Sci. Total Environ.*, 2014, **497–498**, 153–162.
- 5 J. M. Rosas-Castor, J. L. Guzmán-Mar, A. Hernández-Ramírez, M. T. Garza-González and L. Hinojosa-Reyes, *Sci. Total Environ.*, 2014, **488–489**, 176–187.
- 6 P. N. Williams, M. R. Islam, E. E. Adomako, A. Raab, S. A. Hossain, Y. G. Zhu, J. Feldmann and A. A. Meharg, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 4903–4908.
- 7 J. F. Ma, N. Yamaji, N. Mitani, X. Y. Xu, Y. H. Su, S. P. McGrath and F. J. Zhao, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 9931–9935.
- 8 F. J. Zhao, J. L. Stroud, T. Eagling, S. J. Dunham, S. P. McGrath and P. R. Shewry, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, **44**, 5464–5468.
- 9 J. G. Parsons, A. Martinez-Martinez, J. R. Peralta-Videa and J. L. Gardea-Torresdey, *Chemosphere*, 2008, **70**, 2076–2083.
- 10 J. Tyson, *ISRN Anal. Chem.*, 2013, 835371.
- 11 N. S. Horner and D. Beauchemin, *Anal. Chim. Acta*, 2013, **758**, 28–35.
- 12 A. J. Signes-Pastor, S. W. Al-Rmalli, R. O. Jenkins, A. A. Carbonell-Barrachina and P. I. Haris, *J. Food Sci.*, 2012, **77**, T201–T206.
- 13 G. Raber, N. Stock, P. Hanel, M. Murko, J. Navratilova and K. A. Francesconi, *Food Chem.*, 2012, **134**, 524–532.
- 14 M. B. de la Calle, I. Baer, P. Robouch, F. Cordeiro, H. Emteborg, M. J. Baxter, N. Brereton, G. Raber, D. Velez, V. Devesa, R. Rubio, T. Llorente-Mirandes, A. Raab, J. Feldmann, J. J. Sloth, R. R. Rasmussen, M. D'Amato and F. Cubadda, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **404**, 2475–2488.
- 15 M. D'Amato, F. Aureli, S. Ciardullo, A. Raggi and F. Cubadda, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 207–213.
- 16 K. Wrobel and K. Wrobel, in *Handbook of Mineral Elementgs in Food*, ed. M. De la Guardia and S. Garrigues, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 2015, pp. 391–453, DOI: 10.1002/9781118654316.ch18.
- 17 O. P. Diaz, I. Leyton, O. Muñoz, N. Nuñez, V. Devesa, M. A. Suner, D. Velez and R. Montoro, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 1773–1779.
- 18 L. Garcia-Rico, L. Tejeda-Valenzuela, D. Velez and R. Montoro, *J. Sci. Food Agric.*, 2012, **92**, 1725–1731.
- 19 L. W. Rooney and S. O. Serna-Saldivar, in *Corn: Chemistry and Technology*, ed. S. A. Watson and P. E. Ramsted, Am Assoc Cereal Chem, St. Paul, Minn, 1987, pp. 399–429.
- 20 K. Wrobel, G. R. Valtierra Marquez and M. L. Rodriguez Almanza, *Biol. Trace Elem. Res.*, 1999, **68**, 97–106.
- 21 B. Sadee, M. E. Foulkes and J. S. Hill, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **30**, 102–118.
- 22 J. Feldmann and E. M. Krupp, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 1735–1741.
- 23 M. Welna, A. Szymczycha-Madeja and P. Pohl, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2015, **65**, 122–136.
- 24 R. R. Rasmussen, Y. Qian and J. J. Sloth, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 7851–7857.
- 25 Y. Huang, J. Shan, B. Fan, Y. He, S. Xia, Y. Sun, J. Lu, M. Wang and F. Wang, *Anal. Methods*, 2015, **7**, 8896–8900.
- 26 A. Tyburska, K. Jankowski and A. Rodzik, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2011, **66**, 517–521.
- 27 Y. Zhang, W. Wang, L. Li, Y. Huang and J. Cao, *Talanta*, 2010, **80**, 1907–1912.
- 28 D. Sanchez-Rodas, W. T. Corns, B. Chen and P. B. Stockwell, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, **25**, 933–946.
- 29 E. Yanez Barrientos, K. Wrobel, J. C. Torres Guzman, A. R. Corrales Escobosa and K. Wrobel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 203–211.
- 30 J. Zhang, G. Zhang, C. Zhao, X. Quan and Q. Jia, *Microchem. J.*, 2012, **100**, 95–99.
- 31 C. K. Tanabe, H. Hopfer, G. Gilleland, A. Liba, S. E. Ebeler and J. Nelson, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 1223–1227.
- 32 Y. R. Ramos Arroyo, A. H. Serafin Munoz, E. Yanez Barrientos, I. Rodríguez Huerta, K. Wrobel and K. Wrobel, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2013, **91**, 539–544.
- 33 S. S. Kannamkumarath, K. Wrobel, K. Wrobel and J. A. Caruso, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 1458–1463.
- 34 W. Maher, S. Foster, F. Krikowa, E. Donner and E. Lombi, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 5821–5827.
- 35 J. H. Huang, G. Ilgen and P. Fecher, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, **25**, 800–802.
- 36 N. B. Issa, V. N. Rajakovic-Ognjanovic, A. D. Marinkovica and L. V. Rajakovic, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **706**, 191–198.
- 37 G. Chen and T. Chen, *Talanta*, 2014, **119**, 202–206.
- 38 G. Yang, J. Zheng, K. Tagami and S. Uchida, *Chemosphere*, 2014, **111**, 554–559.
- 39 Journal, 2012, ICH.
- 40 K. Wrobel and K. Wrobel, *Spectrosc. Lett.*, 2009, **42**, 269–276.

- 41 A. R. Corrales Escobosa, A. Gomez Ojeda, K. Wrobel, A. Alcazar Magana and K. Wrobel, *Food Chem.*, 2014, **165**, 444–450.
- 42 L. M. Del Razo, G. G. Garcia-Vargas, J. Garcia-Salcedo, M. F. Sanmiguel, M. Rivera, M. C. Hernandez and M. E. Cebrian, *Food Chem. Toxicol.*, 2002, **40**, 1423–1431.
- 43 I. Algül and D. Kara, *Food Chem.*, 2014, **157**, 70–76.
- 44 T. Llorente-Mirandes, J. Calderon, F. Centrich, R. Rubio and J. F. Lopez-Sanchez, *Food Chem.*, 2014, **147**, 377–385.
- 45 D. T. Heitkemper, K. M. Kubachka, R. P. Halpin, M. N. Allen and N. V. Shockey, *Food Addit. Contam., Part B*, 2009, **2**, 112–120.
- 46 R. Rendon-Villalobos, L. A. Bello-Pérez, P. Osorio-Díaz, J. Tovar and O. Paredes-López, *Cereal Chem.*, 2002, **79**, 340–344.
- 47 S. Mallick, G. Sinam and S. Sinha, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2011, **74**, 1316–1324.
- 48 F. J. Zhao, S. P. McGrath and A. A. Meharg, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2010, **61**, 535–559.
- 49 O. Muñoz, O. P. Diaz, I. Leyton, N. Nuñez, V. Devesa, M. A. Suñer, D. Velez and R. Montoro, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 642–647.



Determination of major and minor elements in Mexican red wines by microwave-induced plasma optical emission spectrometry, evaluating different calibration methods and exploring potential of the obtained data in the assessment of wine provenance[☆]

Tania Lizeth Espinoza Cruz¹, Moises Guerrero Esperanza¹, Kazimierz Wrobel, Eunice Yanez Barrientos, Francisco Javier Acevedo Aguilar, Katarzyna Wrobel*

Chemistry Department, Division of Natural and Exact Sciences, University of Guanajuato, L. de Retana 5, 36000 Guanajuato, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Red wine
Microwave-induced plasma optical emission spectrometry
Calibration methods
Elemental analysis
Principal component analysis

ABSTRACT

In this work, the determination of major and trace elements in Mexican wines was carried out by microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES), setting sample dilution as the pretreatment procedure. The elements were grouped according with the required dilution fold: 1:100 for K; 1:50 for Na, Mg, Ca; 1:10 for Rb, Sr, Mn, Fe, Al and 1:4 for Cu, Cr. Due to troublesome background noise, different for each sample, matrix-matching with individual wines was necessary and three quantification methods were explored: classic standard additions (SA), standard dilution analysis (SDA) and multi-energy calibration (MEC). In order to avoid extrapolation in assessing the actual concentration of internal standard at each dilution point and to allow for longer integration time during signal acquisition, SDA was modified (nominated MSDA) and was recommended for the determination of minor elements whereas for major elements the suitable method was MEC. The results obtained by MSDA and MEC were in good agreement with those provided by SA; however, background correction was not required and both methods offer more simplicity as compared to SA. The concentration ranges found in the Mexican wines were as follows: 866–4896 mg L⁻¹ K, 32.7–326 mg L⁻¹ Na, 56.6–164 mg L⁻¹ Mg, 63.9–121 mg L⁻¹ Ca, 0.56–1.90 mg L⁻¹ Sr, 0.35–6.31 mg L⁻¹ Rb, 0.21–2.11 mg L⁻¹ Fe, 0.69–1.72 mg L⁻¹ Mn, 0.28–0.78 mg L⁻¹ Al, 0.10–0.42 mg L⁻¹ Cu, and Cr was not detected. Principal component analysis (PCA) allowed for separation of wines according with the winery regions: Valle de Guadalupe, Guanajuato, Aguascalientes. Furthermore, PCA revealed association of Rb, K, Ca, Sr with wines produced in Guanajuato and association of Na, Cu and Mn with those produced in Valle de Guadalupe; wines from Aguascalientes contained relatively high concentration of Fe and Al, although tight clustering of variables was not observed in this case. To establish reliable discrimination model, more samples from these and possibly from other winery regions in Mexico need to be analyzed.

1. Introduction

Profiling of the major, trace and ultra-trace elements in wine has often been undertaken within different frameworks [1–3]. Typical factors affecting the status of metals/metalloids in wine comprise site-specific soil composition, nutritional requirements and minerals uptake by the grape plants, agricultural practices as well as the additives used during wine elaboration and maturation [4–9]. Based on the

accumulated data, elements found in wine have been classified as major: Na, Mg, K, Ca (> 10 mg L⁻¹); trace: B, Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr, Rb (0.1–1.0 mg L⁻¹); and ultra-trace: Li, Sc, Ti, V, Cr, Co, Ni, As, Se, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, Ba, Hg, Tl, Pb, etc. (100 < μg L⁻¹) [10]. Accordingly, it is generally accepted that moderate wine consumption provides essential elements, principally Cu, Zn and Fe [3]. On the other hand, vulnerability to contamination with toxic elements during plant growth and wine manufacturing/maturation must be considered as an opposite

[☆] Selected Paper from the Colloquium Spectroscopicum Internationale XLI & I Latin American Meeting on Laser Induced Breakdown Spectroscopy (CSI XLI - I LAMLIBS) held in Mexico City, Mexico, June 9–14, 2019.

* Corresponding author.

E-mail address: katarzyn@ugto.mx (K. Wrobel).

¹ The two authors contributed equally to this work.

effect, imposing potential health threat [1,11–14]. Certain elements are of relevance for sensorial properties, such is the case of Al, Ca, Na present in flocculating agents [15]. Potassium is another element of interest which is abundant in wine and is implicated in pH controlling by tartaric acid [16]. Furthermore, redox-cycling elements Fe and Cu present in wine, may affect redox equilibria which are essential for the taste and appearance, and contribute in well-known antioxidant properties of wine [17]. The wines with perceived salty taste are characterized by relatively high concentrations of Na, K, Mg and Ca [18]. Finally, adequate levels of Mg and Ca are required for efficient fermentation [6]. In addition to the above aspects, the determination of metals/metalloids may be helpful in the assessment of wine provenance [19–23]; in particular, the utility of major wine elements for this purpose has been demonstrated [24,25].

North Mexico is the oldest grape-growing region in the Americas; at the beginning of XVI century, wine produced there was distributed in other American Colonies and vines were transplanted where now Napa Valley is located [26]. With the long tradition of wine making, nowadays about 85% of national production comes from the wineries in Baja California, principally from Valle de Guadalupe [27]. Different wine grape plantations have also been installed in other geographical regions, among them in central Mexico states of Aguascalientes and Guanajuato. Currently, Mexican wine is imported to different countries, including US, Canada and Holland [28]. Chemical composition of wine is regulated by Official Mexican Norms NOM-142-SSA1/SCF1–2014 and NOM-199-SCFI-2017, where the maximum permissible concentrations were set for Pb and As at 0.5 mg L^{-1} , for Na at 230 mg L^{-1} , for K at 1700 mg L^{-1} and for CaO at 300 mg L^{-1} [29,30]. It is noteworthy that maximum allowed concentrations are not uniform among different countries and that International Code of Oenological Practices of the International Organization of Vine and Wine (OIV) includes values for seven following elements: 0.01 mg L^{-1} Cd, 0.15 mg L^{-1} Pb, 0.2 mg L^{-1} As, 1.0 mg L^{-1} Cu and Br, 5 mg L^{-1} Zn and 80 mg L^{-1} B [31]. It should also be emphasized that data related to metals/metalloids content in Mexican wines are scarce [18,32].

Certainly, the determination of metals/metalloids in wine is an important analytical task, requested in various routine applications. As to the analytical tools, inductively coupled plasma - mass spectrometry is considered a gold standard, especially for trace and ultra-trace elements, but direct sample introduction or simple dilution is not feasible due to high content of organic compounds in wine [19,33], unless specialized introduction system is applied [34]. Among other atomic spectrometry techniques, microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES) is an interesting alternative, offering higher tolerance to the total solids and organic solvents/matrices as compared to other plasma-based techniques, as well as very low instrument operating cost due to the utilization of nitrogen plasma. Although MIP OES does not allow for the determinations at low-part-per-billion concentrations levels, several major and trace metals of interest in wine analysis are amenable for this technique, as demonstrated in few recent studies [12,35–37].

Simple dilution of wine and quantification by external standard calibration (EC) are always preferred, especially for long sample series; however different chemical environment in the calibration solutions as compared to the real-world matrices and spectral background fluctuating from sample-to-sample, are typical limiting factors. To solve these problems and keep sample pretreatment as simple as possible, matrix-matching calibration by the method of standard additions (SA) can be used. Even though SA is generally accepted as highly reliable, few additions are needed per each sample which makes the procedure tedious. On the other hand, two recently proposed quantification methods allow for simplification of the operations since only two solutions need to be prepared, both containing constant sample volume and dilution, and one of them is spiked with known concentration of analyte(s) [37–41]. In particular, standard dilution analysis (SDA) makes use of internal standard (IS) and is based on the real-time signal acquisition during

incorporation of the diluted sample into the solution containing this same diluted sample, to which analyte standards and IS were added [38,39]. Analyte concentration is computed from the concentration of added standard and from of slope of linear regression function relating the analyte-to-IS intensities ratio against the inverse of the internal standard concentration at different dilution points. In the second method, denominated multi-energy calibration (MEC), analyte signals in two sample solutions (with and without standard addition) are acquired at different wavelengths, corresponding to the spectral lines characteristic for each element [37,40,41]. Individual spectral lines of a given element present different intensities, because transition energy, transition probability and excited-state degeneracy are specific for each permitted transition; however, ratios between signals magnitudes at each wavelength are always proportional to the ratio of analyte concentrations in two solutions. Therefore, analyte concentration in the sample can be calculated knowing the concentration of added standard and using the slope of linear regression function, which relates signals intensities acquired in two solutions at each wavelength [37].

The first goal of this work was to set up MIP OES procedure for the determination of K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Sr, Rb, Al, Cr in wines, using sample dilution as the pretreatment procedure. To this end, four quantification methods (EC, SA, SDA, MEC) were comparatively evaluated and a modification of standard dilution analysis (MSDA) was proposed. The second goal was to examine the feasibility of determined elements for distinguishing among different Mexican winery regions; for this purpose, twelve wines from three different regions were analyzed (Valle de Guadalupe, Aguascalientes, Guanajuato) and Principal Component Analysis (PCA) was applied to observe associations of elements concentrations with geographical origin of wine.

2. Experimental

2.1. Reagents and samples

All chemicals were of analytical reagent grade. Deionized water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, Labconco) and HPLC-grade ethanol (Fisher Scientific) were used throughout; ultrapure concentrated nitric acid was from Fluka. The standards solutions of Rb, Cr, Mg, Fe, Al, Cu, K, Ca, Na, Sr, Mn, Y (1000 mg L^{-1} each) were from Sigma.

Twelve red wines produced and bottled in Mexico were purchased in the specialized stores in Guanajuato city and in Leon city, both in central Mexico. Specifically, four wines were from Guanajuato state (G1-G4), five from Valle de Guadalupe in Baja California state (V1-V5) and three were from Aguascalientes state (A1-A3). The wine types were randomly selected and included both, single variety and multi-varietals blends (the description provided in Table 1S, Appendix). For setting the dilution factors, the instrumental conditions and for comparative evaluation of different quantification methods, a Chilean cabernet sauvignon wine was used (W1).

2.2. Instrumentation and operating conditions

An Agilent 4100 MP-AES atomic emission spectrometer equipped with autosampler SPS3, MiraMist® teflon nebulizer and a single-pass glass cyclonic spray chamber and controlled by Agilent MP Expert Software (actualized from MP-AES 4200) was employed. Unless stated different, the instrumental operating conditions were as follows: high air injection flow in the external gas control module, nebulizer pressure at 240 kPa ; pump rate of 6 rpm , nitrogen pressure at 140 psi ; plasma viewing position set at 0 for Sr and Cu, 10 for Na, K, Ca, Mg, Rb, – 10 for Al, Mn and – 20 for Fe and Cr; stabilization time of 20 s , integration time of 3 s ; wavelengths: Na 589.592 nm , K 769.897 nm , Ca 396.847 nm , Mg 285.213 nm , Sr 407.771 nm , Cu 324.754 nm , Fe 373.713 nm , Al 394.401 nm , Mn 403.307 nm , Cr 427.480 nm , Rb 780.027 nm and Y 371.029 nm .

2.3. External standard calibration (EC) and sample preparation

Multielement standard solutions were prepared in 2% v/v nitric acid, which was also used as a blank. Six-point calibration covered the concentration ranges: 0.1–7.0 mg L⁻¹ for Na, Ca, Mg; 0.4–28 mg L⁻¹ for K, 0.01–1.0 mg L⁻¹ for Mn, Fe, Al, Sr, Cu, Cr and 0.01–5.0 mg L⁻¹ for Rb. Auto background correction was applied, and for each element, the analytical signal was acquired as peak height (instrumental conditions given in the previous section). Two mL portions of wine were centrifuged in Eppendorf tubes (13,000g, 10 min), supernatants were combined and then diluted with 2% v/v nitric acid as follows: 1:100 for K; 1:50 for Na, Ca, Mg; 1:10 for Mn, Fe, Al, Sr, Rb; 1:4 for Cu, Cr. Prior to the introduction to MIP OES, the diluted samples were always centrifuged (13,000g, 10 min).

Additionally, three aliquots of wine W1 were digested with nitric acid, as described Text Box 1S (Appendix).

2.4. Standard additions method (SA)

Wines were diluted as described in Section 2.3; multielement determination was carried out separately for each dilution. Three-point standard additions was made with additions corresponding to 50%, 100% and 200% of element concentration in the sample, estimated by external calibration. To do so, appropriate aliquots of standard solutions were added to the diluted wine samples during additional 1:1 dilution. Manual, off-peak correction was applied, and blank-subtracted peak height was used as the analytical signal.

2.5. Standard dilution analysis (SDA, MSDA)

Using previously reported SDA method [38,39], the elements determined in wine were Mn, Fe, Al, Sr, Rb, Cu and Cr. For the first five elements, the dilution factor applied was 1:10 and for Cu, Cr, the dilution factor was of 1:4. Two solutions were prepared for each sample; in the first of them (S1), 2.5 mL of sample were mixed with equal volume of blank (2% v/v nitric acid) and the second (S2) was prepared in the same way, but with the addition of analytes standard solution to get the final concentration of each element corresponding to about 200% of that estimated by EC (Table 1) plus 5.0 mg L⁻¹ of Y as internal standard (IS). The analysis started from the aspiration of blank solution, followed by S2, and once the signals were stabilized, S1 was poured to S2 observing gradual decrease of intensities due to the dilution. Continuous data acquisition was carried out in real-time with 1 s integration time and single replicate for each analyte and for IS; intensities corresponding to the dilution region were taken for calculations of analytes concentrations.

Table 1

Concentration ranges of calibration curves, instrumental quantification limits (QL), wine dilution factors and concentrations of selected elements estimated by external calibration in W1 wine and in Mexican wines.

Analyte	Calibration range, mg L ⁻¹	QL, µg L ⁻¹	Dilution	W1 ^a , mg L ⁻¹	Mexican wines, range, mg L ⁻¹
K	0.4–28	9.8	1:100	1066 ± 46	920–4280
Na	0.1–7.0	1.8	1:50	17.0 ± 0.6	27.2–308
Mg	0.1–7.0	1.7	1:50	87.6 ± 1.6	62.1–181
Ca	0.1–7.0	4.2	1:50	65.9 ± 0.3	65.1–128
Mn	0.01–1.0	11	1:10	2.91 ± 0.05	0.52–1.80
Fe	0.01–1.0	32	1:10	1.22 ± 0.10	nd - 2.40
Sr	0.01–1.0	5.9	1:10	2.25 ± 0.08	0.58–1.84
Rb	0.01–5.0	10	1:10	5.21 ± 0.65	0.51–7.21
Al	0.01–1.0	15	1:10	0.58 ± 0.09	0.34–0.85
Cu	0.01–1.0	4.6	1:4	0.21 ± 0.04	nd - 0.60
Cr	0.01–1.0	14	1:4	0.06 ± 0.02	nd

^a Mean ± SD, based on three replicates.

In the proposed modified standard dilution analysis (MSDA); two solutions were prepared as in SDA, yet element standard addition corresponded to about 50% of analyte concentration estimated in wine by EC and IS concentration was set at 25 mg L⁻¹. Five mL portions of S2 were placed in five tubes; next, different aliquots of S1 (0, 1, 2, 3, 4, 5 mL) were added to S2 in each tube and spectra were registered applying 20 s for stabilization, 5 s for signal integration with three replicates.

In SDA and MSDA, no background correction was applied. After blank subtraction, the linear regression functions were built by taking the reciprocal of the actual IS concentration as independent variable and the analyte-to-IS signal ratio as the dependent variable. Analyte concentration in the sample ($c_{A,s}$) was derived from the slope and the intercept of such obtained function as follows:

$$c_{A,s} = \frac{\text{slope}}{\text{intercept}} * \frac{c_{A,\text{std}}}{c_{IS}}$$

where $c_{A,\text{std}}$ and c_{IS} are the concentrations of analyte standard and internal standard in S2, respectively [38,39].

2.6. Multi-energy calibration (MEC)

The elements determined by MEC were K, Na, Mg and Ca, with wine dilution factors of 1:100 for K and 1:50 for the rest of them. The wavelengths used for these elements were: 643.907 nm, 445.478 nm, 616.217 nm, 430.253 nm, 393.366 nm, 396.847 nm for Ca; 279.553 nm, 280.271 nm, 517.268 nm, 285.213 nm, 383.829 nm, 518.360 nm for Mg; 568.263 nm, 568.820 nm, 615.423 nm, 330.237 nm, 588.995 nm, 589.592 nm for Na; 693.877 nm, 404.721 nm, 344.738 nm, 404.414 nm, 766.491 nm, 769.897 nm for K. For each sample, two solutions were prepared; one of them was the appropriately diluted wine mixed 1:1 with 2% v/v nitric acid (S1) and the second (S2) was the same diluted wine mixed 1:1 with the multielement standard solution to obtain concentration of added analytes corresponding to those estimated in the sample by EC. At each wavelength, spectra for S1 and S2 were acquired without background correction, using the instrumental settings listed in Section 2.2. Linear regression equations were obtained relating the analytes signal intensities in two solutions, obtained at different wavelengths (blank corrected in all cases). The analyte concentration in the sample ($c_{A,s}$) was calculated as described elsewhere [37,40,41], using the following equation:

$$c_{A,s} = \frac{m' * c_{A,\text{std}}}{1 - m'}$$

where $c_{A,\text{std}}$ is the concentration of analyte standard added to the second sample solution (S2) and m' is the slope of the linear regression function mentioned above.

2.7. Statistical analysis

The results presented are means obtained for three independent replicates with respective standard deviations. Statistical unpaired t-test for independent samples was used to compare the mean concentrations obtained by the method of modified standard dilution (MSDA) and the method of multi-energy calibration (MEC) against those assessed by the method of standard additions (SA); F-test was performed to verify equality of variances. Both tests were also used to compare EC results obtained for acid-digested wine W1 with the results obtained by SA, MEC and MSDA in this wine prepared for measurements by dilution. The software used was Microsoft Excel 2010.

To observe possible relationships between the elements concentrations and geographical regions of wine production, principal component analysis (PCA) was performed, using Unscrambler 7.5 software (Camo, Norway).

Significance level was established at $p < .05$.

3. Results and discussion

The elements selected for determination comprised four major (K, Na, Mg, Ca) and seven minor (Mn, Fe, Cu, Sr, Rb, Al, Cr), all of them important in wine quality control and/or potentially helpful in wine separation according with the geographical origin. The study workflow was as follows: (i) setting the MIP OES instrumental conditions, screening selected elements in wines and grouping according with the required wine dilution; (ii) comparative evaluation of different matrix-matching quantification methods based on the analysis of Chilean red wine W1; (iii) application of the established conditions for the determination of elements in twelve Mexican wines; (iv) principal component analysis (PCA).

3.1. Setting MIP-OES instrumental conditions and wine dilution factors

In the first place, analytical wavelengths lacking spectral interferences from other elements potentially present in the sample were localized. Next, standard solutions of individual elements were run, setting instrumental parameters that provided as high as possible signal-to-noise ratio at the selected wavelengths. In these experiments, individual standard solutions containing 1.0 mg L^{-1} of K, Na, Mg or Ca and 0.01 mg L^{-1} of Mn, Fe, Cu, Sr, Rb, Al or Cr in deionized water and in appropriately diluted ethanol (1–3% v/v) were analyzed. In the presence of ethanol, enhanced spectral noise was observed with respect to the aqueous solutions, as shown in Fig. 1S for Al (Appendix). In wine analysis, background was changing from sample-to-sample and automatic correction was unrealistic; in Fig. 2S (Appendix), Al spectra are presented that were acquired for Chilean wine W1 with automatic and manual off-peak background correction. Since the baseline was different for each wine and ethanol addition had already been excluded, matrix-matched external calibration was considered not feasible in this work. Nonetheless, calibration with aqueous standards solutions was performed in order to estimate analytes concentrations in wines, which was necessary to establish the dilution factors and the concentrations of standards to be added in other quantification methods. Linear regression equations and evaluated analytical parameters are presented in Table 2S (Appendix); overall, acceptable linearity with $R^2 > 0.998$ was obtained for all elements; the instrumental quantification limits were in the range $1.7\text{--}9.8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for major elements and in the range $4.6\text{--}32 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for minor elements. Eleven elements were estimated in Chilean W1 wine and in twelve Mexican wines; in this experiment, the MP-AES software option of auto background correction was applied during calibration, and for the samples, correction was set manually using W1 sample diluted appropriately for each element. The obtained results are summarized in Table 1; for each analyte, respective calibration range, instrumental quantification limit, wine dilution factor, mean concentration with respective standard deviation obtained for W1, and concentration range estimated in Mexican wines are presented. As depicted in this Table, four dilution factors were proposed as follows: 1:100 for K; 1:50 for Na, Mg, Ca, 1:10 for Mn, Fe, Sr, Rb, Al and 1:4 for Cu and Cr.

3.2. Comparative evaluation of different calibration methods

The methods listed and operationally described in Materials and methods were applied for the analysis of W1 sample; as already mentioned before, standard additions (SA) was used as well-established and reliable one. Manual background correction was carried out for each wavelength, while introducing appropriately diluted sample and three-point addition was performed, for which the sample was mixed 1:1 with standards solution that contained 0%, 50%, 100% and 200% of the analyte's concentrations found in W1 by EC. All solutions were prepared in 2% v/v nitric acid, which was also used as a blank. In total, three replicates of sixteen solutions were prepared per one sample; according with the established dilution factors, signals of one, three, five or two

Table 2

Determination of major and trace elements in Chilean wine W1 by three matrix-matching quantification methods: SA - standard additions, MSDA - modified standard dilution, MEC - multi-energy calibration. For comparative purposes, the concentrations found in acid-digested W1 sample by external standards calibration (EC) are also included. Concentrations are given as mg L^{-1} and correspond to means with respective standard deviations based on three independent replicates.

Analyte	SA	MSD	MEC	EC
K	1120 ± 51	–	1138 ± 27	1123 ± 18
Na	19.5 ± 0.4	–	19.1 ± 0.6	19.3 ± 0.2
Mg	110 ± 3	–	111 ± 2	109 ± 2
Ca	95.6 ± 1.0	–	94.8 ± 1.4	95.4 ± 0.6
Sr	0.72 ± 0.07	0.81 ± 0.04	–	0.73 ± 0.05
Rb	4.66 ± 0.08	4.59 ± 0.10	–	4.62 ± 0.05
Fe	1.62 ± 0.13	1.52 ± 0.10	–	1.61 ± 0.08
Mn	1.72 ± 0.07	1.69 ± 0.05	–	1.70 ± 0.05
Al	0.35 ± 0.02	0.35 ± 0.04	–	0.36 ± 0.02
Cu	0.39 ± 0.04	0.43 ± 0.07	–	0.36 ± 0.04
Cr	0.16 ± 0.04	nd ^a	–	0.15 ± 0.05

^a nd - not detected.

analytes were acquired in a single run. The results obtained for W1 are presented in Table 2.

For the method of standard dilution (SDA), S2 was initially prepared to obtain the concentrations of added standards corresponding to 200% of those estimated in the sample by EC and Y concentration was set at 1.0 mg L^{-1} . Relatively high analyte standard addition was necessary to get well-defined decrease of analyte signal during dilution. Unfortunately, in some cases negative slope of the equation relating the analyte-to-IS signal ratio with the reciprocal of the actual IS concentration was observed, and the criterion for positive value of this coefficient was:

$$\frac{S_{Ai}}{S_{Af}} < \frac{S_{ISI}}{S_{ISf}}$$

where S stands for signal (emission intensity), A- analyte, IS- internal standard, i- initial point corresponding to non-diluted solution S2, f- final point corresponding to solutions S1 and S2 combined 1:1 in volume.

To meet the above requisite, the IS concentration was increased to 5.0 mg L^{-1} which was adequate for trace elements, but not for major. To avoid excessively high sample dilutions and elevated IS concentrations, the SDA method was used only for minor elements (1:10 and 1:4 wine dilution). As an example, the graph obtained during real-time signal acquisition for Mn in W1 is presented in Fig. 1a; it can be observed that once the dilution of S2 with S1 started, gradual decrease of the analyte and IS signals occurred until reaching stable values corresponding to the end of dilution. The ratios of analyte-to-IS signals from the dilution region were taken and linear regression equation obtained is presented in Fig. 1b; poor linearity can be noted ($R^2 = 0.9737$) for this example, and similar results were also obtained for independent replicates of Mn and for other analytes. It should be emphasized that the actual IS concentration for each dilution point was calculated assuming linear decrease of its initial concentration in S2, which might not be very precise estimation; another weak point of SDA is short integration time, limited by time-resolved mode of signal acquisition. More specifically, to obtain enough calibration points, not longer than 1 s integration time could be applied. Since SDA results were not consistent with those obtained by SA and reproducibility was poor, a modification was proposed to circumvent the limitations mentioned above. As described in Section 2.5, in a modified SDA method (denominated MSDA), also two sample solutions were prepared, but instead of pouring S1 to S2, 1–5 mL aliquots of the solution not containing standards (S1) were added to 5 mL portions of S2 placed in five separated tubes, and elements signals were acquired separately in each

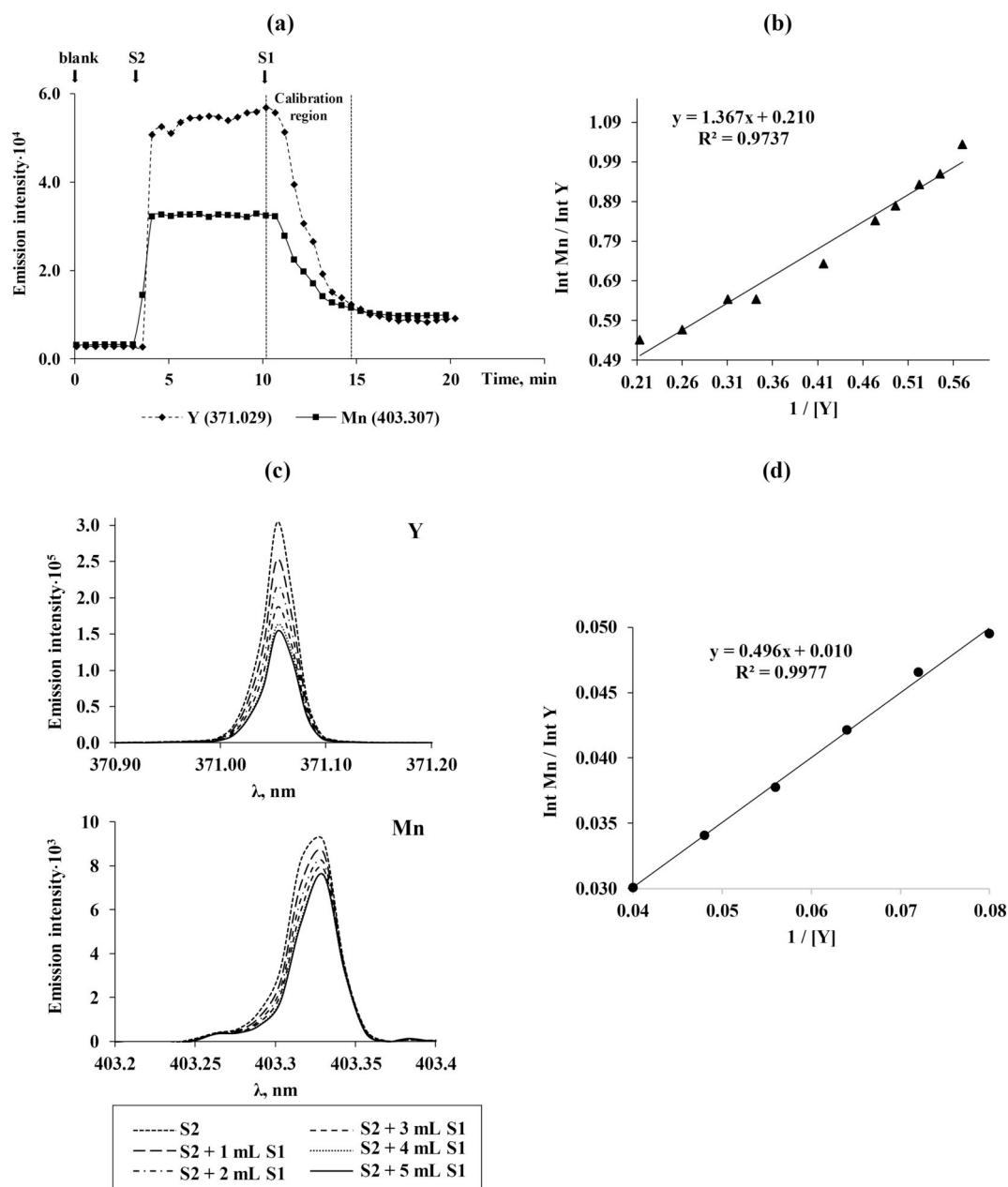


Fig. 1. Application of standard dilution (SDA) and modified standard dilution (MSDA) methods for the determination of Mn in W1 wine (detailed description provided in Section 2.5).

(a) SDA: a graph obtained during real-time signal acquisition for Mn and Y as IS.

(b) SDA: linear regression calibration curve relating ratios of analyte-to-IS signals ($\text{Int Mn}/\text{Int Y}$) with reciprocals of IS concentrations ($1/[\text{Y}]$) at each point of the dilution region.

(c) MSDA: spectra acquired for Mn and Y in sample with standard addition (S2) and after successive addition of the aliquots of S1 (sample diluted with blank) to 5 mL of S2.

(d) MSDA: calibration curve obtained as for SD.

solution, using integration time of 5 s. By so doing, the exact concentrations of IS in each solution could be calculated and longer integration were used yielding less noisy signals. In Fig. 1c, spectra acquired for Mn and IS in the analysis of W1 sample are presented and in Fig. 1d, calibration curve is shown, which was obtained in the same manner as in SDA method. Clearly, the proposed modification provided better linearity ($R^2 = 0.9977$) and much better precision. In Table 2, the concentrations found for minor elements in wine W1 are given; no statistical differences were detected between MSDA and SA results in application of F-test and *t*-unpaired test, at significance level $p < .05$. Noteworthy is that MSDA is as efficient as SA, but is operationally

simpler, incorporates internal standard that compensate for possible random errors, and most importantly, after blank-subtracting, background correction is not required.

Another quantification method explored in this work is based on multi-energy calibration (MEC). This is also matrix-matching method, not requiring background correction. As described elsewhere [37,40,41] and summarized shortly in Sections 1 and 2.6, two sample solutions are prepared and analyte spectra are acquired for both of them, measuring signals at different wavelengths of each analyte. The main requirement for successful application of MEC is the availability of at least three interference-free emission lines per element, whose

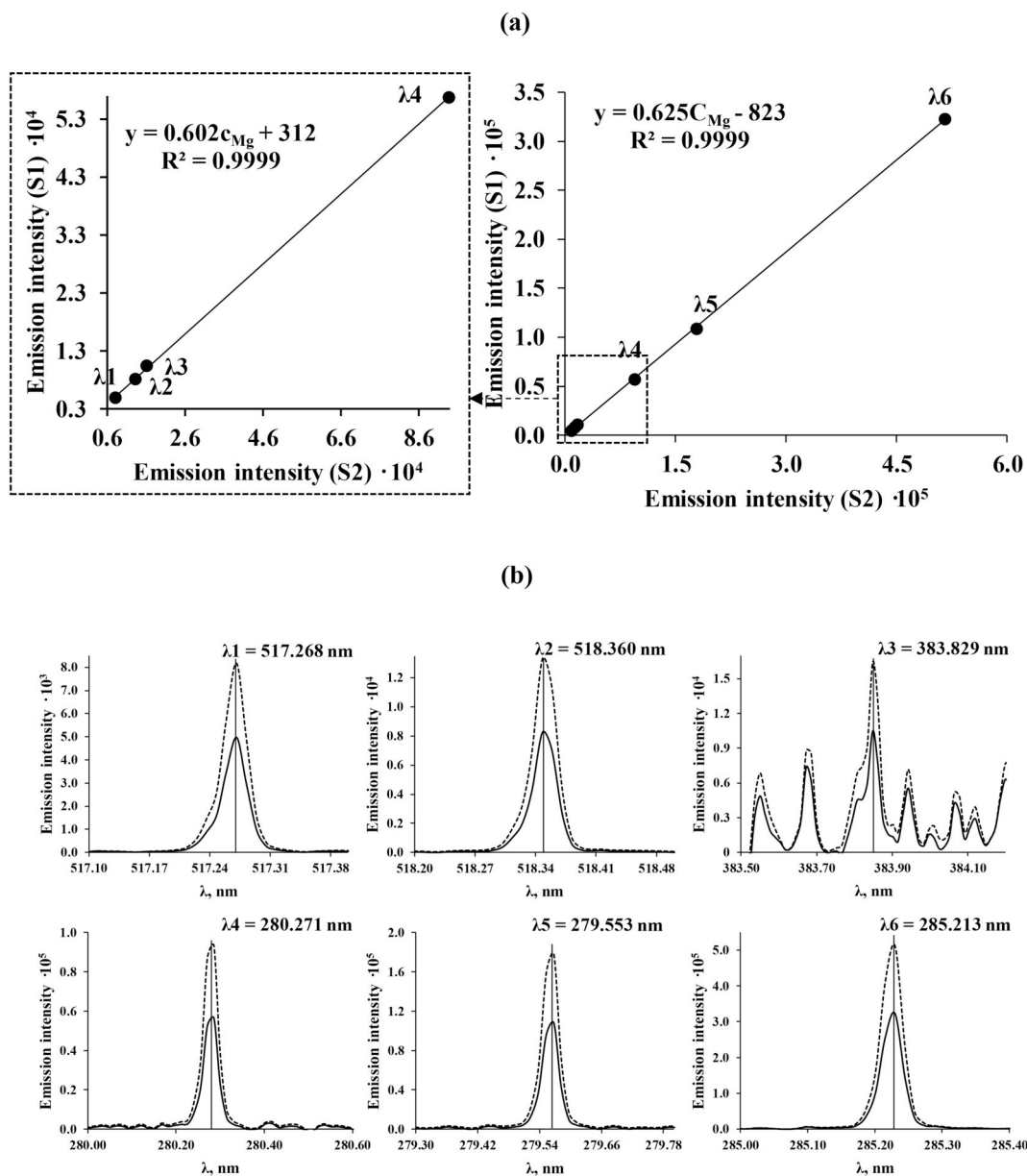


Fig. 2. Application of multi-energy calibration (MEC) for the determination of Mg in W1. (S1- sample with blank, S2 - sample with standards, detailed description provided in Section 2.6)

(a) Calibration graphs obtained for six analytical wavelengths (right) and four wavelength of lower intensity (left).

(b) Spectra of S2 (—) and of S1 (---) acquired at each wavelength.

sensitivities are different and each of them allows for correct signal acquisition in the samples. The latter is quite demanding condition and can be easier met for elements present at relatively high concentrations. In this work, K, Na, Mg and Ca were determined by MEC measuring signals at six wavelengths for each of them (listed in Section 2.6) and keeping previously selected dilution factors. As indicated in Section 2.6, analyte concentration in the sample was calculated based on the concentration of added standard and the slope of calibration function relating analyte signal intensities in two solutions at each of the selected wavelengths. As an example, in Fig. 2a the plot obtained for Mg in wine W1 is presented and spectra registered for two solutions at each of wavelengths are also shown (Fig. 2b). It is noteworthy that very similar slope was obtained for all wavelengths as compared to that obtained for only four less sensitive wavelengths; excellent linearity was obtained in both cases with $R^2 = 0.9999$ (Fig. 2a) and for other elements $R^2 > 0.999$. As reported elsewhere [37], good linearity of calibration

curve in MEC supports the lack of spectral interferences at all applied wavelengths [37]. The concentrations of four elements determined by MEC in wine W1 are presented in Table 2. Statistical comparison of MEC and SA results by F-test and t-unpaired test showed no differences at $p < .05$.

Owing to differences between MEC and SA used for major elements and between MSDA and SA used for minor elements, good agreement of the results provided by these pairs of methods (at $p < .05$) is indicative of acceptable accuracy. As described above, the differences among these methods comprise: (i) method-specific preparation of the sample for instrumental protocol measurements, (ii) application of IS only in MSDA, (iii) background correction only in SA, (iv) application of six wavelengths per element in MEC, (v) method-specific definition of analytical signal and the principle applied for calculation of the concentrations. For further accuracy testing, three aliquots of wine W1 were digested with nitric acid to eliminate organic matrix, and the

Table 3

Comparative evaluation of three quantification methods used in this work for the determination of elements directly in diluted wines. (SA – standard additions, MSD – modified standard dilution; MEC – multi-energy calibration, Roman numerals I, II, III are used to indicate decreasing order).

Parameters	SA	MSDA	MEC
Coverage	All elements	Minor elements	Major elements
Sample pretreatment		Dilution with nitric acid 2% v/v	
Number of solutions per dilution	4	2	2
Composition of the solutions	DW + B; DW + 50%STD; DW + 100%STD; DW + 200%STD	S1: DW + B (1:1) S2: DW + [50%STD + IS] (1:1)	S1: DW + B (1:1) S2: DW + 100%STD (1:1)
Signal acquisition	Directly for each solution	Directly for S2 and then, for five solutions obtained by mixing S2 (5 mL) with different aliquots of S1 (1–5 mL)	Directly for each solution
Number of wavelengths per analyte	1	1	6
Background correction	Manual, off-peak	Not required	Not required
Sample and nitric acid consumption	I	II	III
Simplicity of manual operations	III	II	I
Simplicity of signal acquisition	I	I	II
Simplicity of calculations	II	II	I
Total analysis time	II	I	III

DW - diluted wine: 1:100 for K, 1:50 for Na, Mg, Ca, 1:10 for Sr, Rb, Mn, Fe, Al; 1:4 for Cu, Cr; B - blank; nitric acid 2% v/v; STD - mixed standard solution containing the analytes; percentages values indicate concentration of added standard with respect to that EC-estimated in the sample; IS - internal standard.

analytes were determined in such prepared samples by EC. The results are presented in Table 2, where their good agreement with SA, MSDA and MEC is clearly observed; however, the EC results were different while comparing diluted W1 against acid digested W1 wine (Tables 1 and 2).

Based on the results presented above for different calibration methods applied for the analysis of wine W1, matrix-matching is needed for elements determination in wines prepared by simple dilution and the sample should be used for efficient matching. Three quantification methods explored in this work was found as suitable for such analysis; the classic standard additions (SA), the modified standard dilution (MSDA) and the multi-energy calibration (MEC). The comparative evaluation of these three methods is presented in Table 3. Whereas the first of them provided quantification of all analytes, MSDA was suitable for seven minor elements and MEC for four majors. Nonetheless, the applicability of MSDA could possibly be extended by increasing sample dilution to include K, Na, Ca and Mg; however higher dilution factors might deteriorate precision. For MEC, spectral lines were selected among those listed in the instrument manufacturer Software; however, using spectral libraries (for example the one from NIST), the number of suitable wavelengths per element might be increased possibly facilitating the quantification of minor elements. As to the baseline correction, SA is the most demanding among the three methods evaluated, since manual peak correction must be performed per each wine sample and each dilution; the important advantage of MSDA and MEC is that no background correction is needed. Overall simplicity in terms of manual operations, signals acquisition and calculations, is estimated in Table 3 annotating the methods in a decreasing order. In regard with total analysis time, the shortest correspond to MSDA which is followed by SA and MEC; in the latter, relatively long time is due to setting instrumental parameters individually for each wavelength. Finally, specific advantage in MSDA is the use of IS. Based on the above evaluation and the results obtained in this work, MSDA is recommended for the determination of minor elements in wines and MEC for those majors.

3.3. Determination of selected elements in Mexican wines

The experimental and instrumental parameters established for wine W1 were used for the determination of eleven elements in twelve Mexican wines. According with the previous section, all analytes were determined by SA, MSDA was applied for seven minor elements and MEC for four major ones. The obtained results are presented in Tables 3S and 4S (Appendix); noteworthy is that the consistency between MSDA and SA, as well as between MEC and SA was very good; among

120 results (chromium was not detected in any of the Mexican wines), statistical difference between concentrations found by two methods was found for three MEC results and for eight MSDA results. It should also be mentioned that, using SA quantitative results were obtained for all elements in all samples but MSDA method failed for Fe in two samples and for Cu in six samples.

Based on SA results, the concentration ranges found in the Mexican wines were as follows: 866–4896 mg L⁻¹ K, 32.7–326 mg L⁻¹ Na, 56.6–164 mg L⁻¹ Mg, 63.9–121 mg L⁻¹ Ca, 0.56–1.90 mg L⁻¹ Sr, 0.35–6.31 mg L⁻¹ Rb, 0.21–2.11 mg L⁻¹ Fe, 0.69–1.72 mg L⁻¹ Mn, 0.28–0.78 mg L⁻¹ Al, 0.10–0.42 mg L⁻¹ Cu; as already mentioned before, Cr was not detected in any Mexican wine. According with the Mexican Official Norms regulating Na, K and CaO concentrations in alcoholic beverages with maximum permissible levels of 230 mg L⁻¹, 1700 mg L⁻¹ and 300 mg L⁻¹, respectively [29,30], only one wine from Valle de Guadalupe contained excessive Na concentration (326 ± 18 mg L⁻¹) whereas K exceeded maximum permissible levels in all wines from Guanajuato and in two wines from Valle de Guadalupe. Some of the elements determined in this work are regulated in Croatia (10 mg L⁻¹ Al, 0.1 mg L⁻¹ Cr, 1.0 mg L⁻¹ Cu, 20 mg L⁻¹ Fe, 20 mg L⁻¹ Na) [42]; all Mexican wines surpassed maximum permissible concentration for Na allowable in that country. The analyzed wines complied with German legislation regulating Al at 8 mg L⁻¹ and Cu at 5 mg L⁻¹, and also had lower concentrations of Cu as compared with those set by OIV and in Italy (1 mg L⁻¹ and 5 mg L⁻¹, respectively) [1]. Furthermore, our results are consistent with concentration ranges reported previously in Mexican wines for Ca (70–130 mg L⁻¹), Mg (100–180 mg L⁻¹), K (800–1600 mg L⁻¹) and Na (up to 270 mg L⁻¹) [18]. In Brazilian wines [24], the concentrations of Ca (5.6–119 mg L⁻¹), Cu (0.02–0.97 mg L⁻¹), and Sr (0.12–1.9 mg L⁻¹) were similar to those found in this work yet lower concentrations were reported for Na (4.2–56 mg L⁻¹), K (810–2560 mg L⁻¹), Rb (2.0–9.1 mg L⁻¹) and higher for Mn (1.64–8.59 mg L⁻¹). Nelson et al. [35] demonstrated differences between red wines from California in USA and Argentina, based on MIP OES- determined Sr, Rb, Mg, Ca, Na and K; the concentrations found in Argentinian wines for Sr (0.23–1.59 mg L⁻¹) and Ca (33.2–95.1 mg L⁻¹) were closer to our results whereas Californian wines contained similar concentrations of Rb (0.57–7.83 mg L⁻¹) and Mg (61.8–149 mg L⁻¹); for Na and K, the results of the present work were higher with respect to both, Californian and Argentinian wines (up to 2200 mg L⁻¹ K and up to 122 mg L⁻¹ Na [35]). Bentlin et al. [43] used ICP-MS for the determination of 45 elements in red wines from South America; in general, the concentrations of elements assessed in the present work fit within the ranges reported for wines produced in Brazil, Argentina, Chile or Uruguay; however,

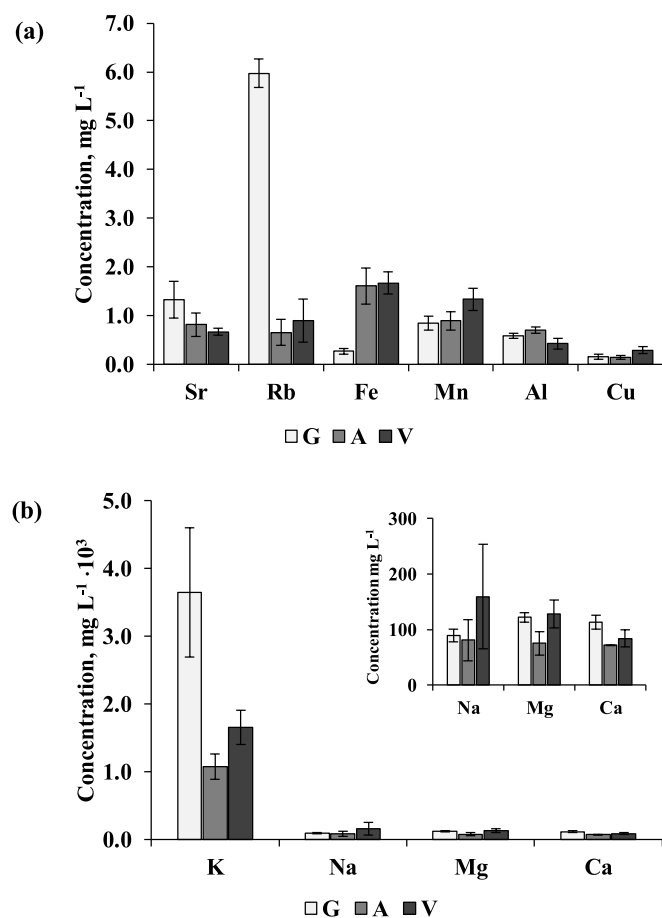


Fig. 3. Concentrations of selected elements in Mexican wines; each bar represents mean result with respective standard deviation, based on individual results obtained for all samples from a given winery region: G - Guanajuato, A - Aguascalientes, V - Valle de Guadalupe.

(a) Minor elements.

(b) Major elements.

Mexican wines had higher levels of Na and, for some wines also for K and Sr. It is noteworthy that relatively high concentrations of major elements found in this work, support the description of Mexican wines as “salty” by both, winemakers and consumers [18].

The similarities and differences detected among elements concentrations in wines from different geographical regions of America, including Mexico, motivated us to inquire the feasibility of major and trace elements determined in this work for separation of wines produced in three different Mexican winery regions.

3.4. Examining the feasibility of major and trace elements in distinguishing geographical origin of Mexican wines

In Fig. 3, mean element concentrations values with respective standard deviations are presented for each winery region. At the first glance, differences between regions can be observed practically for all elements, with distinctively high levels of Rb and K in wines produced in Guanajuato and significantly higher concentrations of Mn and Na in those made in Valle de Guadalupe, as compared to other regions. To attain possible relationships between elements concentrations and geographical region of wine production, principal component analysis (PCA) was carried out [44]. Data obtained for all investigated elements in twelve Mexican wines were used to construct PCA model, in which two first principal components accounted for 74% of total data variability. In Fig. 4a, scores plot is presented, where wine grouping according with the winery region is clearly observed. The distribution of

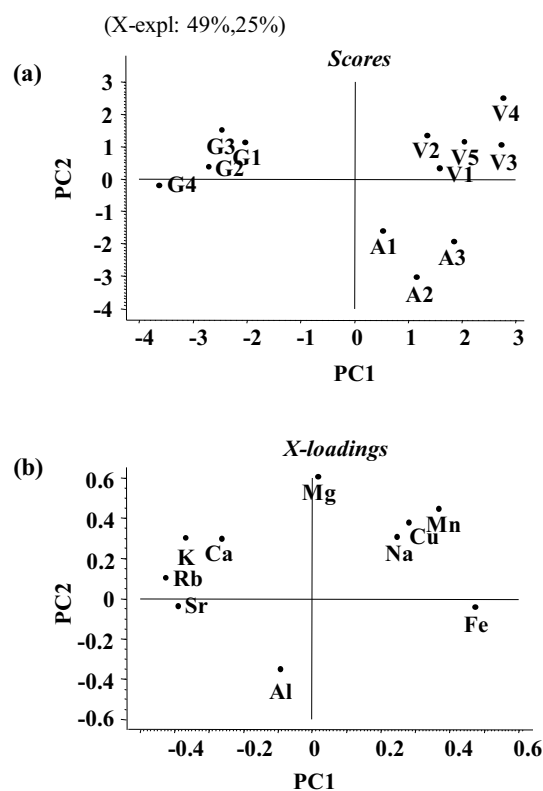


Fig. 4. Bidimensional model obtained by principal component analysis for the concentrations of ten elements in Mexican wines from three winery regions; the first two principal components account for 49% and 25% of total data variability, respectively.

(a) Scores plot showing the distribution of samples according with the winery region: G1-G4 Guanajuato, A1-A3 Aguascalientes, V1-V5 Valle de Guadalupe.

(b) X-loadings plot showing the distribution of elements in this same bidimensional space as scores plot.

variables in two-dimensional X-loading plot (Fig. 4b) shows similar grouping as in the scores plot. Specifically, K, Rb, Sr and Ca variables were associated with wines from Guanajuato whereas high concentrations of Na, Cu and Mn formed cluster in the space corresponding to the wines produced in Valle de Guadalupe. Magnesium was associated with both, Guanajuato and Valle de Guadalupe regions and indeed, this element was found at similar concentrations in wines from the two regions whereas its levels in the products from Aguascalientes were lower. No well-formed cluster of variables exists in the space corresponding to the group of samples from Aguascalientes; however, it is perceived that Fe, Al and Sr were associated with these wines.

As far as we are aware, elements concentrations in Mexican wines had been reported only in one previous study and only for wines produced in Baja California state [18]; high Na concentrations found in that study support association of Na with Valle de Guadalupe products observed in PCA model. Furthermore, hydrogeochemical study carried out in the sole aquifer of Valle de Guadalupe revealed contamination with Cu caused by fertilization products [45], which reinforces association of Cu with wines from this region in PCA model. In regard to Guanajuato, it is a silver and gold mining area, whose geology is related to Cretaceous volcano-sedimentary sequence with abundant quartz and calcite minerals [46], which might contribute to high concentrations of K, Rb, Sr and Ca found in wines. In relevance to our results, discrimination of Brazilian wines from different geographical regions was achieved based on Rb, Sr, K and Mn concentrations [24].

Although only twelve randomly selected products were analyzed in this work, PCA results indicate that profiling of metals amenable for MIP OES determination might be a feasible means for the

discrimination of wines according with the region of their production. As can be noted in Fig. 4, there was no clear association of any element with Aguascalientes wines; however, these wines were evidently separated from Guanajuato wines, despite direct geographical vicinity of the two states. Certainly, a higher number of representative samples needs to be analyzed to ensure statistical significance necessary for establishing suitable discrimination model.

4. Conclusions

In this work, MIP OES was used for the determination of major and trace elements in Mexican wines pursuing two goals: (i) to achieve reliable quantification in conditions suitable for the analysis of long sample series; (ii) to explore the feasibility of MIP OES in elemental analysis for the separation of wines produced in different geographical regions.

In the first part of the study, simple dilution of wine with nitric acid 2% v/v was proposed as sample pretreatment and dilution factors were set. In such prepared samples, different matrix-matching quantification methods were comparatively evaluated; based on the obtained results, a modification of standard dilution was proposed (MSDA) and was recommended for the determination of trace elements whereas for major elements, multi-energy calibration (MEC) was found suitable. The two methods provided analytes concentrations consistent with the results of classic standard additions, yet both were operationally simpler and with no need for background correction. Utilization of Y as internal standard should be mentioned as the strong point of MSD.

In the second part, target elements were determined in twelve Mexican wines and differences were observed among wines, depending on their provenance. Principal component analysis allowed for separation of three winery regions and revealed association of Rb, K, Ca, Sr with wines made in Guanajuato whereas Na, Cu and Mn were associated with products from Valle de Guadalupe. Wines from Aguascalientes contained relatively high concentration of Fe and Al, although tight clustering of variables was not observed in this case. PCA results are promising; however, to establish reliable discrimination model, a higher number of representative samples needs to be analyzed.

Declaration of Competing Interest

All authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was funded by Universidad de Guanajuato, grant 106/2019 and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología in Mexico (CONACYT), project A1-S-9671.

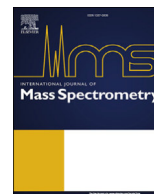
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105754>.

References

- [1] B. Tariba, Metals in wine-impact on wine quality and health outcomes, *Biol. Trace Elem. Res.* 144 (2011) 143–156.
- [2] A. de Villiers, P. Alberts, A.G. Tredoux, H.H. Nieuwoudt, Analytical techniques for wine analysis: an African perspective; a review, *Anal. Chim. Acta* 730 (2012) 2–23.
- [3] P. Pohl, What do metals tell us about wine? *Trace Anal. Chem.* 26 (2007) 941–949.
- [4] F.A.V. Vázquez, B.P. Cid, S.R. Segade, Assessment of metal bioavailability in the vineyard soil-grapevine system using different extraction methods, *Food Chem.* 208 (2016) 199–208.
- [5] C. Gómez, M. del Mar, R. Brandt, N. Jakubowski, J.T. Anderson, Changes of the metal composition in German white wines through the winemaking process. A study of 63 elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2953–2961.
- [6] R.M. Birch, M. Ciani, G.M. Walker, Magnesium, calcium and fermentative metabolism in wine yeasts, *J. Wine Res.* 14 (2003) 3–15.
- [7] D.E. Mackenzie, A.G. Christy, The role of soil chemistry in wine grape quality and sustainable soil management in vineyards, *Water Sci. Technol.* 51 (2005) 27–37.
- [8] F.D. Bora, C.I. Bunea, T. Rusu, N. Pop, Vertical distribution and analysis of micro-, macroelements and heavy metals in the system soil-grapevine-wine in vineyard from North-West Romania, *Chem. Cent. J.* 9 (2015) 19.
- [9] A.D. Kaya, R. Bruno de Sousa, A.S. Curvelo-Garcia, J.M. Ricardo-da-Silva, S. Catarino, Effect of wood aging on wine mineral composition and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ isotopic ratio, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 4766–4776.
- [10] G. Grindlay, J. Mora, L. Gras, M.T. de Loos-Vollebregt, Atomic spectrometry methods for wine analysis: a critical evaluation and discussion of recent applications, *Anal. Chim. Acta* 691 (2011) 18–32.
- [11] G. Formicki, R. Stawarz, A. Gren, R. Muchacka, Cadmium, copper, lead and zinc concentrations in low quality wines and alcohol containing drinks from Italy, Bulgaria and Poland, *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 1 (2012) 753–757.
- [12] C.K. Tanabe, H. Hopfer, G. Gilleland, A. Liba, S.E. Ebeler, J. Nelson, Total arsenic analysis in Californian wines with hydride generation-microwave plasma-atomic emission spectroscopy (HG-MP-AES), *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 1223–1227.
- [13] V. Angelova, A. Ivanov, D. Braikov, K. Ivanov, Heavy metal (Pb, Cu, Zn and Cd) content in wine produced from grape cultivar Mavrud, grown in an industrially polluted region, *OENO One* 33 (1999) 119–131.
- [14] M. Semla, P. Schwarcz, J. Mezey, L.J. Binkowski, M. Błaszczuk, G. Formicki, A. Greń, R. Stawarz, P. Massanyi, Biogenic and risk elements in wines from the Slovak market with the estimation of consumer exposure, *Biol. Tr. Elem. Res.* 184 (2018) 33–41.
- [15] A. Mierczynska-Vasilev, P.A. Smith, Current state of knowledge and challenges in wine clarification, *Austral. J. Grape Wine Res.* 21 (2015) 615–626.
- [16] A.D. Coulter, M.G. Holdstock, G.D. Cowey, C.A. Simos, P.A. Smith, E.N. Wilkes, Potassium bitartrate crystallisation in wine and its inhibition, *Austral. J. Grape Wine Res.* 21 (2015) 627–641.
- [17] J.C. Danilewicz, Review of oxidative processes in wine and value of reduction potentials in enology, *Am. J. Enol. Vitic.* 63 (2012) 1–10.
- [18] A. Cabello-Pasini, V. Macías-Carranza, A. Siqueiros-Valencia, M.A. Huerta-Díaz, Concentrations of calcium, magnesium, potassium, and sodium in wines from Mexico, *Am. J. Enol. Vitic.* 64 (2013) 280–284.
- [19] J. Karasinski, J.C. Torres Elguera, A.A. Gonzalez Ibarra, K. Wrobel, E. Bulska, K. Wrobel, Comparative evaluation of red wine from various European regions using mass spectrometry tools, *Anal. Lett.* 51 (2018) 2645–2659.
- [20] I. Zinicovscaia, O.G. Dului, O.A. Culicov, R. Sturza, C. Bilici, S. Gundorina, Geographical origin identification of Moldavian wines by neutron activation analysis, *Food Anal. Methods* 10 (2017) 3523–3530.
- [21] P.P. Coetzee, F.P. Van Jaarsveld, F. Vanhaecke, Intra-regional classification of wine via ICP-MS elemental fingerprinting, *Food Chem.* 164 (2014) 485–492.
- [22] P. Serapinas, P.R. Venskutonis, V. Aninkevičius, Ž. Ežerinskis, A. Galdikas, V. Juzikienė, Step by step approach to multi-element data analysis in testing the provenance of wines, *Food Chem.* 107 (2008) 1652–1660.
- [23] X. Capron, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, Multivariate determination of the geographical origin of wines from four different countries, *Food Chem.* 101 (2007) 1608–1620.
- [24] W. Boschetti, R.T. Rampazzo, M.B. Dessuy, M.G.R. Vale, A. de Oliveira Rios, P. Hertz, V. Manfredi, P.G. Celso, M.F. Ferrão, Detection of the origin of Brazilian wines based on the determination of only four elements using high-resolution continuum source flame AAS, *Talanta* 111 (2013) 147–155.
- [25] M.P. Fabiani, R.C. Arrúa, F. Vázquez, M.P. Diaz, M.V. Baroni, D.A. Wunderlin, Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines, *Food Chem.* 119 (2010) 372–379.
- [26] M. del Carmen Morfin, The history and current status of the Mexican wine industry, *Int. J. Wine Mark.* 11 (1999) 58–63.
- [27] C.O. Trejo-Pech, R. Arellano-Sada, A.M. Coelho, R.N. Weldon, Is the Baja California, Mexico, wine industry a cluster? *Am. J. Agric. Econ.* 92 (2011) 569–575.
- [28] J. Covarrubias, L. Thach, Wines of Baja Mexico: a qualitative study examining viticulture, enology, and marketing practices, *Wine Econ. Policy* 4 (2015) 110–115.
- [29] Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1/SCFI-2014, Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial, https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5386313&fecha=23/03/2015, (2014).
- [30] Norma Oficial Mexicana NOM-199-SCFI-2017, Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba, http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5502882&fecha=30/10/2017, (2017).
- [31] International Oenological Practices of the International Organization of Vine and Wine, www.oiv.int/public/medias/3741/e-code-annex-maximum-acceptable-limits.pdf.
- [32] P.E. Acuña-Avila, M.S. Vázquez-Murrieta, M.O.F. Hernández, M. del Socorro López-Cortés, Relationship between the elemental composition of grapeyards and bioactive compounds in the cabernet sauvignon grapes *Vitis vinifera* harvested in Mexico, *Food Chem.* 203 (2016) 79–85.
- [33] J. Godshaw, H. Hopfer, J. Nelson, S.E. Ebeler, Comparison of dilution, filtration, and microwave digestion sample pretreatments in elemental profiling of wine by ICP-MS, *Molecules* 22 (2017) 1609.
- [34] C. Cerutti, C. Sánchez, R. Sánchez, F. Ardini, M. Grotti, J.L. Todolí, Determination of trace elements in undiluted wine samples using an automatized total sample consumption system coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 34 (2019) 674–682.
- [35] J. Nelson, H. Hopfer, G. Gilleland, D. Cuthbertson, R. Boulton, S.E. Ebeler, Elemental profiling of Malbec wines made under controlled conditions by microwave plasma atomic emission spectroscopy, *Am. J. Enol. Vitic.* 66 (2015) 373–378.
- [36] M.Y. Jung, J.H. Kang, Y.S. Choi, J.Y. Lee, J.S. Park, Analytical features of microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES) for the quantitation of

- manganese (Mn) in wild grape (*Vitis coignetiae*) red wines: comparison with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES), *Food Chem.* 274 (2019) 20–25.
- [37] A. Virgilio, D.A. Gonçalves, T. McSweeney, J.A.G. Neto, J.A. Nóbrega, G.L. Donati, Multi-energy calibration applied to atomic spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 982 (2017) 31–36.
- [38] W.B. Jones, G.L. Donati, C.P. Calloway Jr., B.T. Jones, Standard dilution analysis, *Anal. Chem.* 87 (2015) 2321–2327.
- [39] D.A. Gonçalves, T. McSweeney, M.C. Santos, B.T. Jones, G.L. Donati, Standard dilution analysis of beverages by microwave-induced plasma optical emission spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 909 (2016) 24–29.
- [40] R.C. Machado, A.B.S. Silva, G.L. Donati, A.R.A. Nogueira, Multi-energy calibration as a strategy for elemental analysis of fertilizers by microwave-induced plasma optical emission spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom* 33 (2018) 1168–1172.
- [41] E. Tognoni, M. Hidalgo, A. Canals, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, A. Salvetti, V. Palleschi, Combination of the ionic-to-atomic line intensity ratios from two test elements for the diagnostic of plasma temperature and electron number density in inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 435–443.
- [42] Ministry of Education, Health and Social Care of the Republic of Croatia, Legislation on wine production (original in Croatian), *Narodne Novine* 2 (2005), <http://narodne-novine.nn.hr/>.
- [43] F.R. Bentlin, F.H. Pulgati, V.L. Dressler, D. Pozebon, Elemental analysis of wines from South America and their classification according to country, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 327–336.
- [44] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, Principal components analysis, *Chemom. Intel. Lab. Syst.* 2 (1987) 37–52.
- [45] L.W. Daessle, L.G. Mendoza-Espinosa, V.F. Camacho-Ibar, W. Rozier, O. Morton, L. Van Dorst, K.C. Lugo-Ibarra, A.L. Quintanilla-Montoya, A. Rodriguez-Pinal, The hydrogeochemistry of a heavily used aquifer in the Mexican wine-producing Guadalupe Valley, Baja California, *Environ. Geol.* 51 (2006) 151–159.
- [46] A. Carrillo-Chavez, O. Morton-Bermea, E. Gonzalez-Partida, H. Rivas-Solorzano, G. Oesler, V. Garcia-Meza, E. Hernandez, P. Morales, E. Cienfuegos, Environmental geochemistry of the Guanajuato Mining District, Mexico, *Ore Geol. Rev.* 23 (2003) 277–297.



Comparative evaluation of two *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* strains grown on two different carbon sources: LC-MS - based secretome study after in vivo ¹⁵N metabolic labeling



Kazimierz Wrobel ^a, Katarzyna Wrobel ^a, Bianey Garcia Lara ^a,
Moises Guerrero Esperanza ^a, Maria Isabel González Roncero ^b,
Alma Rosa Corrales Escobosa ^{a,*}

^a Chemistry Department, University of Guanajuato, L. de Retana 5, 36000, Guanajuato, Mexico

^b Department of Genetics, University of Cordoba, E-14071, Cordoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 September 2019

Received in revised form

2 December 2019

Accepted 27 December 2019

Available online 28 December 2019

Keywords:

Quantitative proteomics

Metabolic labeling

Liquid chromatography

Mass spectrometry

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*

Pathogenicity

Secretome

ABSTRACT

To get new insight on the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, metabolic labeling was performed, and secretomes of the wild type strain 4287 (W) and non-virulent mutant Δ chsV (M) were compared while switching the main carbon source from glucose (Glc) to the freeze-dried vascular tomato tissue (VTT). ¹⁴N- or ¹⁵N-containing KNO₃ was used for fungal growth and two combined (¹⁴N/¹⁵N) protein extracts were obtained: 1- W + M in Glc; 2- W + M in VTT. Trypsin digests of 1 and 2 were analyzed by capHPLC-ESI-QTOF-MS and Skyline was applied to compare the abundances of individual proteins between two strains in each sample and between the samples. Protein grouping was suggested as follows: (1) seven proteins apparently adsorbing on VTT were of importance during the initial stage of invasion; (2) three adsorbing on VTT were involved in compensative mutant adjustment, in growth and nutrients supply; (3) eleven might contribute in pathogenicity without direct interaction with the plant cell wall; (4) fourteen were involved in mutant adaptation, fungal growth and nutrients supply, not excluding their role in pathogenicity. The above proteins comprised carbohydrate-active enzymes, protein/peptide- and lipid-hydrolyzing enzymes, few classified as effectors (NEP-like, serine protease, GLEYA adhesion domain, LysM domain), catalyzing redox processes and few of unknown function.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Among different species of soil-born filamentous fungi, *Fusarium oxysporum* is classified as one of the top ten fungal pathogens, causing wilt disease on a variety of plants [1]. In particular, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* acts as a pathogen of tomato [2]. Understanding the physiological and molecular bases of fungal pathogenicity is necessary for designing strategies against pest that is responsible for world-wide agronomic losses. Indeed, numerous studies have been focused of the elucidation of pathogenic determinants in *F. oxysporum* [3–11] with increasing applications of “omics” tools in this research area [6,7,12–15].

In functional genomics approach, several processes and specific genes involved in virulence can be assessed and manipulated to

obtain strains of decreased pathogenicity [7,13]. The topics of interest include: transcription factors, different components of cAMP-PKA and MAPK pathways, transcriptional regulators, lineage specific (LS) chromosomes, genes involved in cell wall biosynthesis, secretion enzymes and avirulence/effector proteins [1,2,11]. Within the context of this work, deletion Δ chsV mutant of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* with alteration in the fungal cell wall biosynthesis, showed strongly lower virulence with respect to the wild type strain (4287), demonstrating the requirement for a class V chitin synthase during host infection [16–18]. As reported in the cited works, after deletion of class V chitin synthase gene the mycelial growth of mutant was only slightly declined as compared to the wild type strain but the cell wall chitin content was decreased by 10%.

In proteomics studies, valuable information on proteins involved in the pathogen-host interaction can be obtained, especially while focusing on the fungal cell wall components [19] or

* Corresponding author.

E-mail address: alma_rce@ugto.mx (A.R. Corrales Escobosa).

secretome [10,20,21]. In addition to the characterization of full proteome or secretome of a given organism, functional roles of proteins can be assigned by assessing dynamic changes occurring due to different growth conditions or via comparative proteomics of different phenotypes [6,8,9,14,22,23]. In regard to *Fusarium* genus, considerable effort has been devoted to secretome of *Fusarium graminearum* [10,24,25] whereas limited data are available for *F. oxysporum* [26]. Given the pathogenicity and the lifestyle of the latter, the challenge of secretome analysis is to identify proteins facilitating invasion and colonization of the host, those efficiently defeating defensive response, and those ensuring food supply from the host [20,27].

Liquid chromatography with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) in combination with fit-per-purpose platform of data analysis shapes a powerful proteomics tool enabling for gel-free identification of thousands of proteins in a single analytical run [28,29]. Quantitative approach is more challenging, especially when the assessment of changes in the protein amount needs to be evaluated based on the independent analytical runs of two or more samples. Indeed, in label-free quantitative proteomics, abundances of the peptide ions acquired in LC-HRMS or LC-MS/MS spectral counts of the identified protein are taken from different datasets obtained for individual samples. Some requirements of label-free quantification include: (i) unambiguous finding of these same peptides in different chromatograms and acquisition of their abundances avoiding spectral interferences, (ii) acceptable repeatability achieved during the pretreatment and LC-MS/MS analysis of two different samples in biological and technical replicates [30]. These issues become less troublesome while using stable isotope labeling methods that allow for the analysis of mixtures of two or more samples in a single run [31]. The strength of stable isotope labeling relies on the negligible effect of isotopic composition on the physicochemical properties of a given compound and on the isotopic capabilities of mass spectrometry, therefore, this same peptide coming from different samples can be easily detected by the expected mass shift between ions eluting at the same retention time. It should be stressed that stable isotope labeling has been used in several studies comparatively evaluating fungal proteomes [32–34]; however, as far as we are aware, no such approach has been applied to *F. oxysporum* secretomes. Among different chemical, enzymatic or metabolic tagging procedures available [30,35], *in vivo* metabolic labeling seems an attractive and feasible alternative for this task. By introducing ^{15}N containing inorganic salt to one of the cultures, proteins become labeled during their synthesis and can be distinguished from proteins in the another culture, in which this same salt with natural nitrogen isotope distribution was applied [33,36]. Based on the ion currents count, molar ratios between these same proteins in two cultures can be computed. Since the equivalent proteins amounts from the two cultures are combined prior to the sample treatment and analysis, the quantitative comparison is hardly affected by any of these procedural steps thus enabling for reliable assessment of biological effects [36]. On the other hand, relative quantification of peptides/proteins is not straightforward because of the presence of light nitrogen isotope in the inorganic salt used for labeling (below 2% ^{14}N); other issues that need to be considered involve the changing number of nitrogen atoms among different peptides and the uncertain enrichment yield of these atoms achieved during organism growth [37,38]. One of the informatic platforms supporting quantitative proteomics based on metabolic labeling is the freely available Skyline (<http://proteome.gs.washington.edu/software/Skyline>). In particular, Skyline is fully compatible with LC-MS/MS data from different instrument vendors and it provides different tools of statistical analysis and data visualization [39].

The goal of this work was to get new insight on the

pathogenicity of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* at secretome level. To this end, the wild type strain (4287) causing vascular wilt disease in tomato and non-virulent ΔchsV mutant [16–18] were used; each of them was grown in minimum medium with glucose or with addition of the freeze-dried tomato vascular tissue as the main carbon source. For quantitative proteomic analysis, *in vivo* metabolic labeling was performed using ^{15}N in form of potassium nitrate and, after combining two differentially labeled protein extracts and trypsin lysis, the analysis was carried out by capillary liquid chromatography - electrospray ionization - quadrupole time of flight mass spectrometry (capHPLC-ESI-QTOF-MS). Based on the observed differences in proteins abundances between virulent and non-virulent strain and those found while switching carbon source from glucose to the vascular tomato tissue, possible functional role of 35 proteins was suggested.

2. Materials and methods

2.1. Fungi strains and ^{15}N *in vivo* metabolic labeling

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* strains 4287 (race 2) and ΔchsV were generously provided by M.I.G. Roncero (Universidad de Cordoba, Spain); microconidia suspensions were stored in 30% glycerol at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. For propagation, 10^6 microconidia mL^{-1} were inoculated in a series of 250 mL flasks containing 50 mL of a modified Czapek-Dox minimum medium (0.5 g L^{-1} KCl, 0.5 g L^{-1} $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g L^{-1} KH_2PO_4 , 0.01 g L^{-1} $\text{FeSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.0 g L^{-1} KNO_3 , 20 g L^{-1} glucose). Each strain was propagated in eight flasks; potassium nitrate- ^{15}N (Sigma reagent > 98 atom % ^{15}N) was applied in four of them whereas in the other four flasks non-labeled salt was added. All cultures were incubated 24 h at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ with shaking at 150 rpm and then centrifuged (4000 g, 10 min). Each of the obtained mycelia was separately washed with 20 mL of water followed by two 20 mL portions of the respective growth medium and was transferred to 250 mL flask containing 50 mL of medium. At this stage, for the wild type strain (4287) propagated in the presence of potassium nitrate- ^{15}N , freeze-dried tomato vascular tissue (VTT) was added to the medium (0.5 g L^{-1}) and this medium contained 0.5% m/v glucose. Plant tissue was obtained as described elsewhere [40]. For other four portions of 4287 mycelium that were propagated in non-labeled potassium nitrate, new medium contained glucose 1% m/v. The mutant mycelia (M) propagated in the presence of potassium nitrate- ^{15}N , were transferred to medium containing glucose 1% m/v whereas for non-labeled mycelia, the growth medium with lowered glucose (0.5% m/v) was amended with freeze-dried vascular tissue of tomato (0.5 g L^{-1}). All sixteen cultures were incubated for 72 h at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ with shaking at 150 rpm and then filtered (Whatman, $15\text{ }\mu\text{m}$); the recovered liquid media were centrifuged to eliminate fungal spores (2500 g, 5 min). Finally, each supernatant was freeze-dried after addition of phenylmethylsulfonyl fluoride ($50\text{ }\mu\text{L}$, 1 M). Two replicates of each culture were pooled yielding two biological replicates of the following four: (4287-Glc-14N) - wild type strain with natural nitrogen isotope (^{14}N) and glucose 1% v/m as a sole carbon source, (4287-VTT-15N) - wild type strain labeled with ^{15}N , tomato tissue and reduced glucose as a carbon sources, (M-Glc-15N) - ΔchsV labeled with ^{15}N and glucose 1% m/v as a sole carbon source, (M-VTT-14N) ΔchsV with ^{14}N , freeze-dried tomato vascular tissue and reduced glucose as a carbon sources. General scheme of fungal growth and metabolic labeling is presented in the Electronic Supplementary Material (Fig. 1S, ESM2).

It should be stressed that, by providing heavy nitrogen isotope since the early stage of fungi propagation, full labeling was ensured. As to the carbon source, it was verified that glucose was still present at the end of experiment in cultures 4287-Glc-14N and M-Glc-15N

(1% m/v glucose initially added) whereas in cultures 4287-VTT-15N and M-VTT-14N it was depleted after 24 h (0.5% m/v glucose initially added), so in further growth, vascular tomato tissue was the sole carbon source for 4287-VTT-15N and M-VTT-14N cultures. Experimental evidence demonstrating utilization of plant tissue for nutrients supply in 4287-VTT-15N and M-VTT-14N, is provided in Fig. 11S (Electronic Supplementary Material, ESM2). Finally, similar growth of the two strains was observed in glucose, whereas mutant growth was slightly poorer in the presence of tomato tissue, in consistency with previous studies [16–18].

2.2. Proteins extraction and preparation of the mixed samples

The protocol reported elsewhere was adopted [41]. In brief, the freeze-dried pooled supernatants were separately re-constituted in 4 mL of water and filtered (Millex®GP filter unit, 0.22 µm); next, 16 mL of methanol, 4 mL of chloroform and 12 mL of water were added, shaking the mixture after each addition and finally, centrifuged (4000 g, 10 min). Once the upper water-methanol phase was discarded, 12 mL of methanol were added and again, the mixtures were agitated, centrifuged and the upper phase was eliminated. The sediment containing proteins was dried at room temperature and then, re-suspended in a small volume of ammonium bicarbonate 20 mM, pH 8.0. Proteins were quantified by the Bradford method [42] and the final concentration was adjusted to 1 mg mL⁻¹.

Prior to the further treatment, two 0.1 mL aliquots from different extracts were combined yielding 200 µg of proteins in each of two biological replicates of the following mixtures: **(1)** (4287-Glc-14N)+(M-Glc-15N); **(2)** (4287-VTT-15N)+(M-VTT-14N); **(3)** (4287-Glc-14N)+(4287-VTT-15N); **(4)** (M-Glc-15N)+(M-VTT-14N). These mixtures are referred throughout the text as samples **1–4**. Of note is that fungal cultures obtained in the presence of freeze-dried plant tissue were macroscopically different from those containing only glucose, due to visible adhesion of microorganisms on the solid material. Therefore, it was decided to focus the study on samples **1** and **2** that were composed of two strains grown in this same source of carbon (glucose or plant tissue, respectively). Even though equal protein amounts from the two cultures were always combined, the results obtained for samples **3** and **4** (each of them containing this same strain yet grown on different carbon source) were considered unreliable since partial sorption of proteins on the powdered tissue certainly affected the estimation of their actual amount in the analyzed secretome. Nonetheless, samples **3** and **4** were also analyzed and used to support the results obtained for samples **1** and **2**.

2.3. Preparation of tryptic digests

For protein denaturalization, the samples **1–4** were heated at 100 °C for 5 min; then, the reduction was carried by adding 1 µL of DTT 1 M (final concentration 5 mM) and incubation at room temperature during 30 min. For alkylation of cysteinyl thiols, 2 µL of iodoacetamide (IAM) 0.5 M were added (final concentration 10 mM) and the samples were left for 1 h at room temperature in the dark; the excess of IAM was eliminated by adding 1 µL of DTT 1M and keeping the mixture at room temperature during 10 min.

For enhanced coverage in protein analysis, enzymatic deglycosylation was carried out [43]; to this end, 10 µL of PNGase (5U, Sigma F8435) were added and the samples were incubated at 37 °C for 8 h, followed by heating at 100 °C for 5 min to stop the reaction. Once cooled to room temperature, hydrolysis was carried out using 1:50 m/m trypsin-to-protein ratio; after overnight incubation at 37 °C, the reaction was stopped by acidification with formic acid 3.8% v/v, the samples were then centrifuged (16000 g, 2 min) and supernatants were passed to the new vials (protein concentration

0.5 µg µL⁻¹ as referred to non-digested sample). Prior to the analysis, vials were kept at –20 °C.

2.4. capHPLC-ESI-QTOF-MS and MS/MS

The analytical system consisted of a mass spectrometer maXis impact ESI-QTOF-MS equipped with Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics), which was coupled to Ultimate 3000 RLScnano system operated by Hystar 3 software (Thermo Scientific Dionex). The autosampler temperature was kept at 4 °C. The sample aliquot containing 5 µg of the digested proteins (10 µL) was loaded on a Zorbax capillary trap (300SB-C18, 5 × 0.3 mm, 5 µm) during 2 min, using 0.1% aqueous TFA with 1% MeCN v/v as the trap wash solvent and the flow rate 15 µL min⁻¹. Next, the flow was switched to the reversed phase capillary column Zorbax 300Extend-C18 (150 × 0.3 mm, 3.5 µm), maintained at 40 °C. Two mobile phases were used: A - 0.1% aqueous formic acid and B - 0.1% formic acid in MeCN; the total flow rate was 4 µL min⁻¹ with a following gradient elution: 1%–35% B during 80 min; 35%–98% B during 10 min; 98%–1% B during 4 min; 1% B during 4 min; 5 min washing with 1% B was applied for column re-equilibration which resulted in total chromatographic run of 103 min. The column exit was connected to ESI source via 50 cm capillary (i.d. 50 µm) using the lock-mass standard *m/z* 1221.9907 in the ion source. ESI was operated in a positive mode with ion spray voltage 4500 V, end plate offset 500 V, dry gas 4 L min⁻¹, drying temperature 180 °C and nebulizing gas pressure 0.4 bar. The chromatograms were obtained with acquisition rate 2 Hz for MS within the *m/z* range 50–2000. For auto MS/MS mode, filtration for amino acids was applied with acquisition rate 2 Hz and 10 Hz for low (<25000) and high (>25000) counts, respectively. Line spectra calculated as a sum of intensities were always registered. Three technical replicates were performed for each sample; considering two biological replicates of each, 24 chromatograms were acquired.

2.5. Data analysis

Raw capHPLC-ESI-QTOF-MS data were recalibrated and deconvoluted in DataAnalysis 4.4, and then, exported in.mgf format to ProteinScape 3.1.3 (Bruker Daltonics). The initial search of light nitrogen containing proteins was carried out via Mascot engine (version 2.4.0), using FASTA *Fusarium oxysporum* 4287 taxonomy database from UniProtKB. Next, for finding ¹⁵N-labeled and non-labeled proteins, the re-search was performed. The initial precursor mass tolerance of 5 ppm and MS/MS tolerance of 0.1 Da were applied. Trypsin was selected as the hydrolyzing enzyme and two missed cleavages were allowed; carbamidomethylation of cysteines was selected as fixed modification whereas methionine oxidation was allowed as variable modification. Peptide charge states +2 and +3 were set; seven amino acids chain was the minimum length of peptide. For quantification, ¹⁵N metabolic labeling was selected. The decoy was activated, adjusting maximum false discovery rate (FDR) for peptides and proteins to 1%; the statistical significance of Mascot hits was accepted at *p* < 0.05. Once the list of protein was returned, for enhanced reliability, filtration procedure was applied. Acceptable score for the individual ions was set at >21 and significance threshold at *p* < 0.01; by so doing, the average experimental FDR found for individual datasets was 0.06% (screenshot of Mascot filtration parameters applied and experimental decoy FRD for one of the samples is presented in Fig. 3S, ESM2). The list of peptides was exported in a Mascot data file format to Skyline (<http://proteome.gs.washington.edu/software/Skyline>), generating spectral library to which all chromatograms were imported. Of note, in the library, MS and MS/MS data are linked with the respective retention times. Individual peptides

containing light and heavy nitrogen atoms were assigned based on the same retention time, the same peak symmetry and $\text{idotp} > 0.95$. The latter parameter (isotope dot product) denotes the consistency between expected and experimentally observed distribution of the peak areas for precursor ion isotopes (for both, labeled and non-labeled peptides). Each sample contained protein extracts from two cultures; for proteins of high abundance in one of them and very low abundance in another, idotp values > 0.75 were accepted (example for NEP-like protein shown in Fig. 10S in ESM2).

For accurate quantification of changes in protein abundances based on ^{15}N - metabolic labeling, the means of ^{14}N -to- ^{15}N intensity ratios for the most abundant peptide ions with different charges were computed ("mean mean total area ratio" option in Skyline) together with respective standard deviations. To assess the abundance of given protein in the sample composed of two differentially labeled cultures, Skyline provides "sum mean total area", which is calculated considering both, ^{14}N - and ^{15}N -containing signals. The abundances of individual proteins in each fungal culture were calculated based on "sum mean total area" ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$) and "mean mean total area ratios" (^{14}N -to- ^{15}N).

Principal component analysis was performed taking abundances of 38 proteins in each of the cultures as "variables" and four cultures as "cases". All abundances were normalized by standard deviation and a model was computed using the software package The Unscrambler 7.0 (Camo, Ltd.).

3. Results and discussion

In application of the criterions given in Data analysis section 2.5, the lists of proteins in the samples 1 and 2 were obtained and compared, yielding 38 proteins that were common for all fungal cultures. On the bases of UniProt Knowledgebase that contains 17 reviewed and 19730 unreviewed proteins of a wild type race 4287 of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, among 38 selected proteins, several were located as unreviewed with submitted names (further referred to as "characterized"), but the majority corresponded to those uncharacterized with known function or with function suggested by 90–100% identity to other *Fusarium* species. Some proteins with unknown function were also detected. As could be expected based on previous reports on pathogenic fungal secretomes [20,22,24,25,27,44], proteins regulating architecture of the cell wall, those facilitating nutrients supply and providing defense against external stress were identified as well as few directly involved in the invasion of the host plant. The list of 38 proteins together with their UniProtKB code, gene and functional description, is presented as Table 1S in the Electronic Supplementary Material 1 (ESM1). In this Table, the values of mutant-to-wild "mean mean total area ratio" and of "sum mean total areas", both with respective standard deviations, are provided for each protein in samples 1 and 2, based on two biological- and three technical replicates; additionally, the computed abundances of each protein in two extracts composing given sample is included. The above data were obtained via Skyline-aided analysis and allowed us to quantitatively compare the abundances of secreted proteins between ^{15}N and ^{14}N cultures combined in a single sample and, also to make comparisons between the samples. In the Electronic Supplementary Material 2 (ESM2), some examples are given to visualize different stages of data analysis (Fig. 2S: a chromatogram showing separation of peptides belonging to a random protein; Fig. 3S: Mascot screenshot with filtration parameters applied and experimental decoy FRD for one of the samples; Fig. 4S: Skyline screenshot with quantitative data obtained for sample 1; Fig. 5S: Skyline visualization of mass spectrum and idotp values for randomly selected peptide; Fig. 6S: concordance of the retention times between ^{14}N and ^{15}N peptides; Fig. 7S: chromatographic separation of

serine protease peptides in sample 3 and respective peak areas for ^{14}N and ^{15}N in six replicates; Fig. 8S: idotp values for ^{14}N and ^{15}N peptide of serine protease; Figs. 9S and 10S: peak areas and idotp values for NEP-like peptides containing ^{14}N and ^{15}N in sample 3).

In order to propose functional role of secretome proteins in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, the two following issues were addressed: (i) what is the difference between secretomes of pathogenic wild strain and non-pathogenic mutant in the presence of glucose as a sole carbon source; (2) how the presence of tomato vascular tissue (VTT) affects secretomes of the two strains. In the next sections, the discussion is first focused on 38 proteins in sample 1 and then, the results obtained for samples 1 and 2 are comparatively evaluated. As the outcome of this study, proteins were grouped according to their proposed function during nutrient acquisition and possibly, in the initial process of plant infection by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; proteins involved in a compensative adjustment of deletion mutant were also observed.

3.1. Secretomes of 4287 and ΔchsV in the presence of glucose as a sole carbon source (sample 1)

Sample 1 was prepared and analyzed to compare protein profiles in the wild type strain against mutant, in the presence of glucose as the main carbon source. Since down-regulation of class V chitin synthase was associated with the lack of pathogenicity of ΔchsV [16], it was assumed that proteins presenting higher abundance in the wild type strain might be associated with pathogenic potential whereas proteins found in larger amount in mutant would rather be related with fungus adaptation to the deletion of class V chitin synthase gene. For 38 selected proteins, their abundances in the wild type and in mutant strains combined in sample 1 were calculated based on the "sum mean total areas" values and the "mean mean total area ratios"; the obtained results are presented in Fig. 1. Additionally, specific values of mutant-to-wild area ratios with respective standard deviations are given in Table 1S. It can be observed in Fig. 1 and Table 1S that thirteen proteins presented higher abundance in the wild type strain (mutant-to-wild ratio from 0.27 ± 0.09 to 0.72 ± 0.028) and the abundance of fifteen proteins was higher in ΔchsV mutant (mutant-to-wild ratio from 3.35 ± 1.38 to 1.39 ± 0.12). Other proteins were found in similar amounts in the two strains (mutant-to-wild ratio from 0.90 ± 0.07 to 1.28 ± 0.36); it is also noteworthy that four proteins presented relatively high abundances with "sum mean total areas" > 1000 as compared with the range 6.6–700 for other 34 proteins. The proteins abundant in sample 1 were: NEP-like (FOXG_17014), serine protease (FOXG_12263), one uncharacterized from chitin-binding glycosyl hydrolase 18 family (FOXG_10034) and one of unknown function (FOXG_02393). It should be mentioned that, despite difference in the expression of class V chitin synthases certainly existing between the two strains, such difference could not be observed due to the intracellular location of these proteins.

According with the above description and with data presented in Fig. 1 and Table 1S, larger amounts in the wild type strain were found for four characterized and one uncharacterized *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* proteins involved in polysaccharide degradation and/or cell wall organization; in the increasing order of mutant-to-wild abundance ratio, those with submitted names were: alpha-galactosidase (FOXG_04398), glucanase (FOXG_00480), murein transglycosylase (FOXG_11947) and beta-fructofuranosidase lyase (FOXG_03211). The uncharacterized was a protein related to endogluconase B (FOXG_08211), by 90% identity with *F. mangiferae* and *F. oxysporum* (F. vascular wilt). One hydrolytic enzyme identified as carboxylic ester hydrolase (FOXG_11103) from fungal carboxylesterase lipase family was also elevated in the wild type strain. Furthermore, serine protease (FOXG_12263), and one

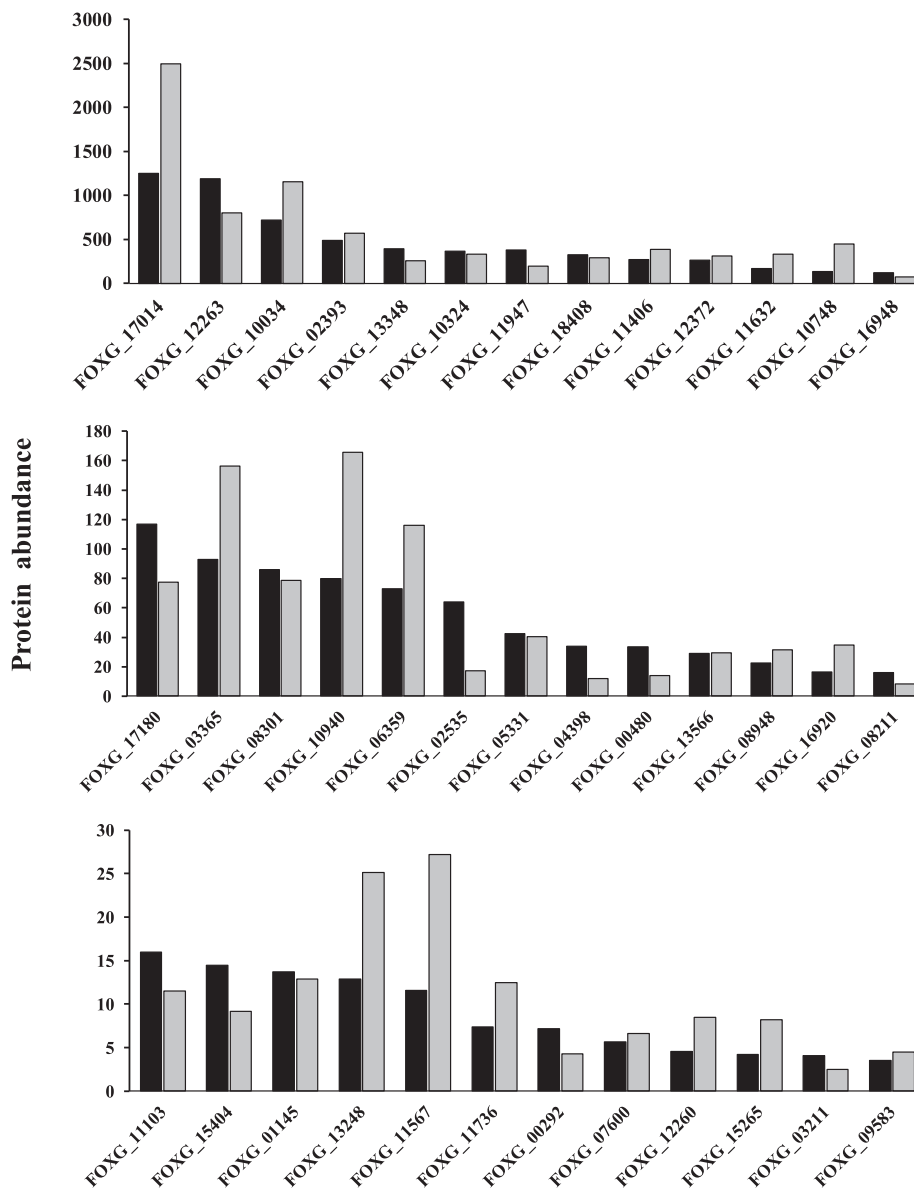


Fig. 1. Abundances of individual proteins in the extracts of wild type (dark gray) and in mutant (light gray) strains combined in sample 1, calculated based on the “sum mean total areas” values and the “mean mean total area ratios” (Table 1S); for better clarity, 38 proteins are separated in three groups according with their decreasing abundance in the wild type strain.

protein presenting serine-type peptidase activity (FOXG_00292) were found at higher abundances in 4287 with respect to the mutant. Additionally, zinc ion binding carboxypeptidase A4 (FOXG_13348) was also elevated in the wild type strain. On the other hand, two proteins presenting higher abundances in the wild type strain were related with redox processes; these were: the characterized catalase peroxidase (FOXG_17180) and one with oxidoreductase activity (FOXG_15404). Finally, two uncharacterized proteins more abundant in the wild type strain presented GLEYA adhesin domain (FOXG_02535) and carbohydrate binding module with lysine-like motif (LysM) domain (FOXG_16948), respectively.

Owing to the difference in virulence between two strains under study, the above results seem to confirm the association of

carbohydrate-active enzymes with the pathogenicity of *E. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, as previously reported in several studies performed on this and other plant infectious fungi [3,9,10,23,25,44]. As to the functional assignment, proteins from this group contribute in disruption of the plant cell wall and provide the fungus with food; noteworthy is however, that the actual requirements differ among fungal species and are also influenced by the external conditions, therefore the group of carbohydrate-active enzymes is usually large and diverse [15,45]. Finding the increased amounts of serine protease (FOXG_12263), a protein with serine-type peptidase activity (FOXG_00292) and carboxypeptidase A4 (FOXG_13348) in the virulent 4287 strain as compared to non-pathogenic mutant is of relevance, due to their demonstrated role as effectors of filamentous plant pathogens [46]. Specific

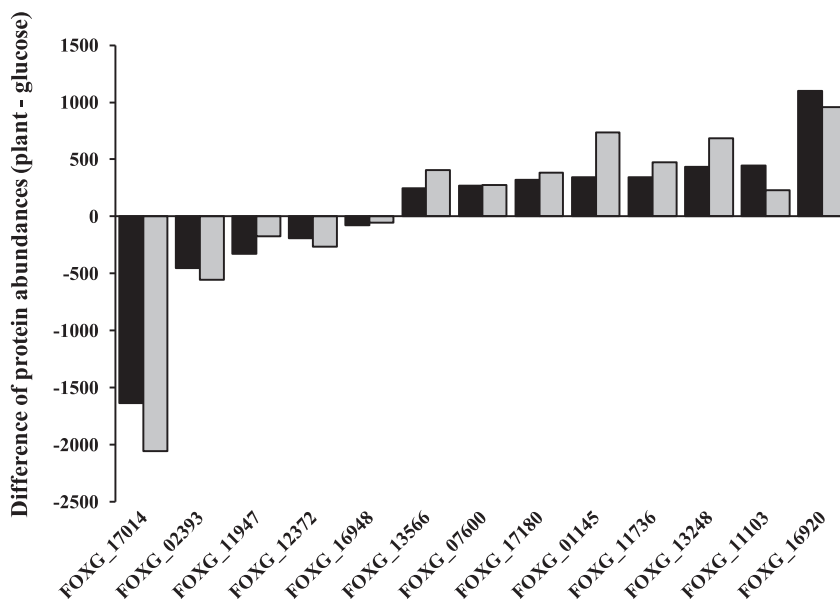


Fig. 2. Effect of vascular tomato tissue on the abundances of individual proteins in the wild type strain (dark gray) and in Δ chsV mutant (light gray). Data were obtained analyzing sample **1** and **2**, respectively; for each protein, difference between its abundance in the strain grown in the presence of plant biomass and glucose is presented (data included in Table 1S).

function of serine proteases during the invasion of a host plant has been proposed as the cleavage of chitin-binding domain in anti-fungal plant chitinases [20]; particularly for *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, a combined synergic action of serine protease and fungalsin metalloprotease was reported [26]. In direct relation with invasion, proteins containing LysM (FOXG_16948) and GLEYA adhesin domain (FOXG_02535) are also of relevance. Fungal adherence to the host surface is a necessary pre-infection stage; among different proposed mechanisms, specific interactions through lectins present on the plant surface should be noted [47]. In *Saccharomyces cerevisiae*, GLEYA was reported as an lectin-like ligand-binding domain of adhesins [48] and higher amount of FOXG_02535 in the wild type strain suggests that similar process might also contribute in the pathogenicity of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Noteworthy is that putative adhesins were predicted in *F. oxysporum* proteome under adhesion-inducing conditions [19]. As to LysM protein, one of the conserved fungal strategies relies on the secretion of effectors containing this motif, which upon binding to chitin oligosaccharides helps to avoid host immune response via expression of chitinases [49–51]. Among other effectors disabling plant immunity during intrusion by this fungus, cysteine-rich proteins secreted in xylem (SIX) have been characterized [20]; however, their expression occurs in the presence of the living host cells [52] hence none such protein could be detected in this study.

In regard with the proteins up-regulated in mutant as compared to the wild type strain in sample **1**, the most pronounced change with mutant-to-wild ratio of 3.35 ± 1.38 was observed for chitinase (FOXG_10748). Other increased proteins involved in the cell wall structure, degradation or modification were: a related to cell wall protein PhiA by 90% identity with *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. mangiferae*, *F. proliferatum* (FOXG_11567), and one from a chitin-binding glycosyl hydrolase 18 family (FOXG_10034). Enhanced abundances in mutant strain were also found for protein/peptide- and lipid-hydrolyzing enzymes. These included: trypsin (FOXG_13248), a protein with amidase domain (FOXG_11632), alkaline ceramidase (FOXG_15265) and putative arabinase, by 90%

identity with *F. oxysporum* (*F. vascular wilt*) and *F. proliferatum* (FOXG_11736). Lithic enzymes alpha amylase (FOXG_16920) and murein transglycosylase (FOXG_06359) were also elevated in the mutant strain. Higher abundance of NEP-like factor (FOXG_17014) with mutant-to-wild ratio 2.00 ± 0.30 should be noted as well as the up-regulated proteins catalyzing redox processes: one with oxidoreductase activity (FOXG_08948), catalase peroxidase (FOXG_12260) and alcohol dehydrogenase (FOXG_11406). Finally, extracellular protein with eight cysteine containing domain (FOXG_03365) and a protein of unknown function (FOXG_10940), were found with higher abundances in mutant as compared to the wild type strain (Fig. 1, Table 1S).

The results summarized above, demonstrate that down-regulation of class V chitin synthase caused notable modification of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* secretome. In filamentous fungi, the assembly and plasticity of cell wall during vegetative growth and morphogenesis rely on the subtle equilibrium between synthesis and degradation of chitin, during which branching and binding with other cell wall components occurs, principally with beta-(1,3)- and beta-(1,6) glucan chains and proteins [53,54]. In this work, up-regulation of chitinase and related enzymes in Δ chsV mutant as well as higher amounts of lipid- and peptide bond hydrolyzing enzymes, suggest that the fungus adjust to the lack of chitin synthase gene, trying to maintain cell wall integrity by getting necessary components from the surrounding environment. Indeed, depending on the deleted gene, different compensative adjustments in the structure of fungal cell wall have been reported [55,56]. Specifically in filamentous fungi, chitinases might participate in cell wall remodeling and facilitate growth under non-optimal conditions providing enhanced defensive capability and contributing to overall fitness [51]. In support to our results, during hyphal growth of *Candida albicans*, chitinase activity was significantly higher in the extracellular space after deletion of chitin synthase gene as compared to the wild type strain [57]. On the other hand, necrosis and ethylene inducing factor (NEP-like) found as abundant protein in sample **1** is of relevance; in addition to its

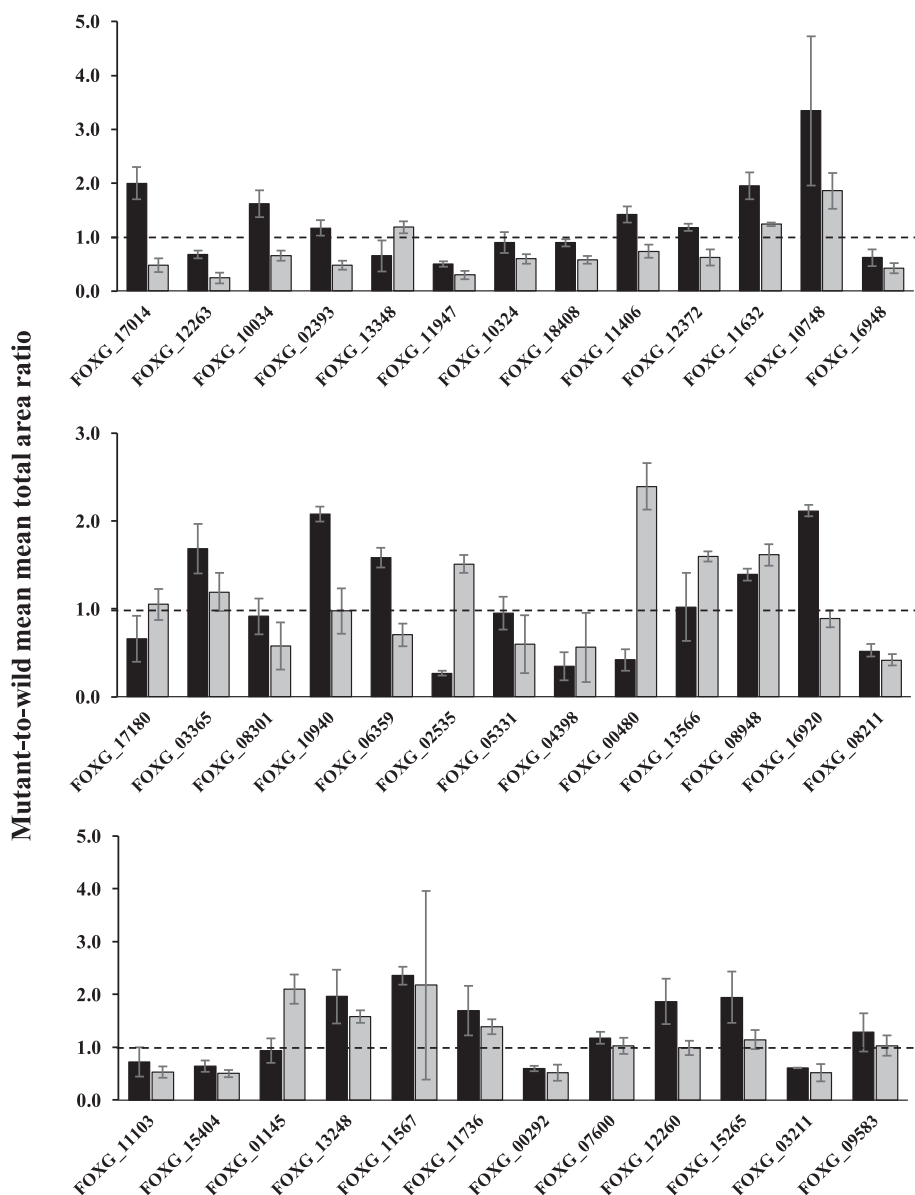


Fig. 3. Mutant-to-wild “mean mean total area ratios” with respective standard deviations obtained for samples **1** (dark gray) and **2** (light gray). In each sample, protein extracts of the two strains were combined; sample **1** contained two strains grown in glucose whereas strains in sample **2** were grown in the presence of vascular tomato tissue as carbon source (data included in Table 1S).

role in wilt disease [20], this family of proteins is involved in vegetative growth and asexual reproduction [58]. Higher abundance observed in mutant with respect to the wild type strain suggests that NEP-like might form a part of compensatory mechanisms through which the mutant adjusts to the lack of class V chitin synthase gene.

Fungal plant pathogens secrete a series of redox-active enzymes, capable of natural polymer degradation [59] and participating in the defense against reactive oxygen species produced by the host plant and/or by environmental stressors [5,44]. In sample **1**, two proteins of this type were increased in the wild type strain (FOXG_17180, FOXG_15404) and three others were higher in $\Delta chsV$ mutant (FOXG_08948, FOXG_12260, FOXG_11406), suggesting that the two strains might apply different proteins for aforementioned purposes.

Four relatively abundant proteins with no marked changes between wild type and mutant strains were: one from ribonuclease T2 family (FOXG_12372), one related to cell wall protein PhiA, by 90% identity with *F. oxysporum* (*F. vascular wilt*) and *F. mangiferae* (FOXG_18408) and two with unknown function (FOXG_02393, FOXG_10324).

It should be stressed once again that sample **1** contained protein extracts of the wild type and mutant strains grown in the absence of host plant therefore the results obtained do not allow for direct assignment of candidate proteins participating in fungus pathogenicity. For this purpose, samples **1** and **2** were analyzed in search of proteins affected by the presence of vascular tomato tissue in each of the two strains.

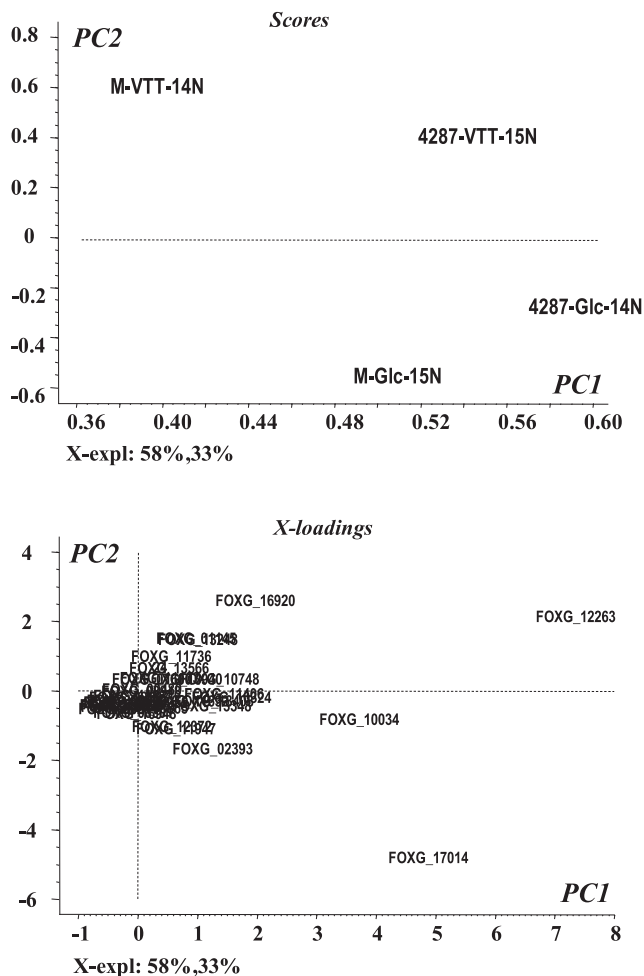


Fig. 4. Principal Component Analysis of the abundances of 38 proteins in four fungal cultures 4287-Glc-14N, M-Glc-15N, 4287-VTT-15N and M-VTT-14N: (a) scores plot showing distribution of cultures and (b) X-loadings plot showing distribution of proteins, both in the reduced dimensionality of PC1 and PC2.

3.2. Effect of the vascular tomato tissue on the protein abundances in the two strains (samples 1, 2)

The sample 2 contained combined extracts of the two strains that were grown in the presence of freeze-dried vascular tomato tissue. Fig. 11S (ESM2) shows altered isotope pattern of randomly selected ^{15}N -containing peptide found in this sample 2 as compared to sample 1, which confirms that fungus was acquiring nutrients from VTT. To observe the effect caused by changing the carbon source, abundances of individual proteins in the wild type and mutant strains were calculated in samples 1 and 2. Next, for each protein in each strain, the abundance found in glucose was rested from that attained in the presence of plant and the differences obtained for thirteen proteins noticeably affected by tomato plant tissue, are shown in Fig. 2. As can be observed in this Figure, abundances of five proteins decreased in the presence of plant tissue in both strains and for eight proteins, higher amounts were found in the presence of VTT. Increased protein expression in the fungal secretomes after switching from glucose to more challenging carbon sources or in the presence of the host, has been reported in several studies [9,12,23,45,60,61]. For plant pathogens, such up-regulation of specific proteins is indicative of their involvement in fungal pathogenicity, in defense against anti-fungal

agents produced by the host and/or in the hydrolytic processes necessary for growth and nutrient supply.

Finding five proteins, whose abundances decreased in both strains after introducing vascular tomato tissue (Fig. 2) was somehow disconcerting; in the order of decreasing difference, these were: NEP-like (FOXG_17014), a protein with unknown function (FOXG_02393), murein transglycosylase (FOXG_11947), one with ribonuclease T2 activity (FOXG_12372) and LysM containing protein (FOXG_16948). This same effect was also observed while analyzing sample 3; as an example, Skyline visualized changes of the abundances for NEP-like peptides in the wild type strain upon switching from glucose to vascular tomato tissue, are shown in Figs. 9S and 10S (ESM2). Decreasing abundances of five aforementioned proteins was ascribed to their sorption on the surface of the powdered tissue rather than to their down-regulation. Given the functional description provided in the previous section 3.1 for most of these proteins, and due to their suggested sorption on the freeze-dried plant tissue, they might be considered as directly associated with pathogenicity and particularly important during the initial stage of plant invasion by fungus. It is noteworthy that the above proteins were abundant in both strains in the presence of glucose, and for majority of them, different amounts were found in mutant with respect to the wild type strain (sample 1, Fig. 1). At this stage however, it is difficult to explain why proteins involved in pathogenicity decreased after introduction of the host tissue similarly in both, virulent and non-pathogenic strains (Fig. 2).

On the other hand, secretome proteins with abundances increased in the presence of vascular tomato tissue were: alpha-amylase (FOXG_16920), carboxylic ester hydrolase from (FOXG_11103), trypsin (FOXG_13248), putative arabinase (FOXG_11736), subtilisin (FOXG_01145), catalase peroxidase (FOXG_17180), lipase (FOXG_07600) and glucoamylase (FOXG_13566).

3.3. Effect of plant tissue on the difference in proteins expression between two strains (samples 1,2)

Quantitative analysis of datasets acquired for samples 1 and 2 provided mutant-to-wild “mean mean total area ratios” with respective standard deviations (two biological and three technical replicates). In each of these samples, protein extracts of the two strains were combined; for sample 1, glucose was applied as a carbon source and for sample 2, both strains were grown in the presence of freeze-dried plant tissue. The obtained mutant-to-wild protein abundances ratios are presented in Fig. 3; the ratio values > 1 indicate higher abundance in mutant strain whereas for proteins of higher abundance in the wild type strain, ratios values < 1 were obtained. In Fig. 3, these same 38 proteins are included as in Fig. 1 (also in Table 1S). It can be noted on the first glance that, in the absence of the host tissue, seventeen proteins were more abundant in $\Delta chsV$ mutant as compared to the wild type strain (sample 1 in Fig. 3); however, in the presence of vascular tomato tissue, this effect became less pronounced (ten proteins more abundant in mutant strain). Certainly, the wild type strain in contact with the host tissue needs to activate mechanisms responsible not only for nutrient supply and defensive response but most importantly, fungus secretes proteins promoting infection. In contrast, the effort of non-pathogenic mutant is always centered principally at compensation of its vulnerability due to deletion of chitinase synthase V gene (Fig. 12S, ESM2, shows the number of proteins up-regulated in each strain in the presence of each carbon source). In this regard, proteins more abundant in the wild type strain in sample 1 and whose mutant-to-wild abundance ratio decreases in the presence of plant tissue as compared to glucose, could be related with pathogenicity. As can be observed in Fig. 3,

these included: serine protease (FOXG_12263), murein transglycosylase (FOXG_11947), a protein related to cell wall protein PhiA (FOXG_18408), LysM containing protein (FOXG_16948), a protein with O-glycosylase activity (FOXG_08301), 1,3-beta-glucanotransferase (FOXG_05331), one related to endoglucanase B (FOXG_08211), carboxylic ester hydrolase (FOXG_11103), a protein with oxidoreductase activity (FOXG_15404), lipase (FOXG_07600), chitinase (FOXG_09583), and a protein of unknown function (FOXG_10324). Increased abundances in the wild type strain after changing glucose to VTT was also observed in the analysis of sample **3** which was a combination of two cultures of this strain grown in different carbon sources; as an example, Figs. 7S and 8S (ESM2) show Skyline visualization for ¹⁵N- and ¹⁴N- containing serine protease peptides in sample **3**.

Second group of proteins included in Fig. 3 was found at higher abundances in mutant in the presence of glucose and, when plant tissue was introduced, the mutant-to-wild ratios for these proteins was lower in sample **2** with respect to sample **1** indicating enhanced synthesis in the wild type strain. These changes are indicative of the involvement of proteins in the mutant adaptation to deletion of *chsV* gene and, also of their possible participation in virulence. Fifteen proteins in this group were: NEP-like (FOXG_17014), one belonging to chitin-binding glycosyl hydrolase 18 family (FOXG_10034), alcohol dehydrogenase (FOXG_11406), a protein with amidase domain (FOXG_11632), chitinase (FOXG_10748), a protein with eight cysteine-containing domain (FOXG_03365), murein transglycosylase (FOXG_06359), alpha-amylase (FOXG_16920), trypsin (FOXG_13248), putative arabinase (FOXG_11736), catalase peroxidase (FOXG_12260), alkaline ceramidase (FOXG_15265), one from ribonuclease T2 family (FOXG_12372) and two proteins with unknown function (FOXG_02393, FOXG_10940).

For six proteins more abundant in the wild type strain in the presence of glucose (Fig. 1), their mutant-to-wild ratios in sample **2** (VTT as the main carbon source) were increased with respect to sample **1** (Fig. 3). It is proposed that these proteins are important in mutant strain when it copes with plant tissue as the main carbon source, yet their possible role during plant invasion cannot be excluded. As already discussed earlier in the text, some proteins preferentially up-regulated in the wild type strain might be adhered to the plant tissue and interact directly with the host cell wall. This group of proteins includes: carboxypeptidase A4 (FOXG_13348), catalase peroxidase (FOXG_17180), a protein containing GLEYA adhesin domain (FOXG_02535), glucanase (FOXG_00480), glucoamylase (FOXG_13566), and subtilisin (FOXG_01145).

Three following proteins were found at higher abundances in the wild type strain with similar mutant-to-wild ratios independently on the carbon source, which also suggests their contribution in virulence: alpha-galactosidase (FOXG_04398), a protein with serine-type peptidase activity (FOXG_00292), beta-fructofuranosidase (FOXG_03211).

Finally, three proteins showed similar abundances ratio between two strains combined in samples **1** and **2** (mutant-to-wild ratio ≥ 1 , Table 1S); since these proteins were not influenced by the presence of host tissue, they probably would not be directly associated with pathogenicity. The proteins in this group were: one with FAD-binding oxidoreductase activity (FOXG_08948), one related to cell wall protein PhiA (FOXG_11567) and one with submitted name lipase (FOXG_07600).

3.4. A proposal for functional assignment of the proteins identified in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* secretome

Taken together the results presented and discussed in the

previous sections concerning abundances of 38 proteins in different extracts and samples, as well as changes of their abundances between two strains of different pathogenicity and between glucose and vascular tomato tissue as a carbon source, the functional assignment of 35 proteins found in secretome of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* has been proposed. The list of these proteins distributed in four groups is presented in Table 1, together with a summary of experimental evidence supporting the proposed ordering.

The first group comprises proteins involved in pathogenicity and/or defensive response, most probably during the initial stage of host invasion. Based on the experimental evidence, a protein with GLEYA adhesin domain (FOXG_02535), three carbohydrate-active enzymes participating in cell wall degradation or in nutrients supply (FOXG_11947, FOXG_00480, FOXG_13566), two proteases (FOXG_01145, FOXG_13348) and catalase peroxidase (FOXG_17180) were included.

Three proteins of importance in mutant adaptation to *chsV* gene deletion and probably associated with plant invasion were collocated in the second group (Table 1). It seems interesting that NEP-like factor, whose functional diversification had previously been suggested [58], apparently was relevant in both, invasion and mutant adaptation. Other proteins were: one from ribonuclease T2 family (FOXG_12372) and one unknown (FOXG_02393).

In the third proposed group (Table 1), proteins involved in pathogenicity and/or defensive response, yet probably not interacting directly with the plant cell wall, were brought together. These included three proteins acting as potential effectors (FOXG_12263, FOXG_16948, FOXG_00292), four hydrolases degrading polysaccharide structures (FOXG_08301, FOXG_04398, FOXG_08211, FOXG_03211), carboxylic ester hydrolase from lipases family (FOXG_11103), a protein with oxidoreductase activity (FOXG_15404), one of unknown function (FOXG_10324) and, unexpectedly, one related to cell wall protein PhiA (FOXG_18408).

Proteins comprised in the last group (Table 1), were assigned as important for mutant adaptation, for growth and nutrient supply yet not excluding their possible association with pathogenicity; these proteins probably did not interact directly with the host cell wall. Three protein/peptide hydrolyzing enzymes (FOXG_11632, FOXG_13248, FOXG_11736), one eight cysteine-containing domain with previously proposed role in fungal pathogenicity [62] (FOXG_03365), alkaline ceramidase (FOXG_15265), six proteins degrading polysaccharides (FOXG_10748, FOXG_06359, FOXG_05331, FOXG_16920, FOXG_10034, FOXG_09583), two with oxidoreductase activity (FOXG_12260, FOXG_11406) and one of unknown function (FOXG_10940), were included.

Finally, each of the above groups contained at least one protein of unknown function, which clearly indicates the urgent need for the advance in functional characterization of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* proteome.

In addition to the protein grouping proposed in Table 1 and discussed above, the abundances of individual proteins in each of the four cultures were submitted to the principal component analysis (data for 4287-Glc-14N, M-Glc-15N, 4287-VTT-15N, M-VTT-14N included in Table 1S). This unsupervised method was used to attain possible relationships existing among variables and cases in the original dataset while reducing its dimensionality; in the obtained model, the first two principal components (PC1, PC2) accounted for 91% of total data variability. In Fig. 4a, a scores plot is shown, in which PC2 separates cultures (cases) according with the carbon source while PC1 is related with the strain type. On the X-loadings plot (Fig. 4b), the variables (proteins) are allocated in this same bi-dimensional space. While comparing scores and X-loadings plots, it is noted that the abundances of four proteins weigh in differences among the four cultures (Fig. 4). Specifically, serine

Table 1
Four groups of proteins and the experimental evidence supporting their proposed role in pathogenicity of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. (Glc - glucose; VTT - vascular tomato tissue the main carbon source; W - wild type strain; M - Δ chsV mutant; A - abundance; **1** - sample composed by W + M, both grown in Glc; **2** - sample composed by W + M, both grown in VTT).

Proteins group	Experimental evidence (<i>deduced effect</i>)	Proteins	
1. Involved in pathogenicity and/or defensive response, preferentially during initial stage of plant invasion	$A(W) \geq A(M)$ in Glc (1)	Carboxypeptidase A4 (FOXG_13348)	
	$A(W)$ in VTT $\leq A(W)$ in Glc (2 vs 1)	Murein transglycosylase (FOXG_11947)	
	$A(M)/A(W)$ in Glc ≤ 1 and different in VTT (1 vs 2)	Catalase peroxidase (FOXG_17180)	
	<i>(preferential synthesis in W for two carbon sources and possible sorption on the plant tissue)</i>	GLEYA adhesin domain (FOXG_02535) Glucanase (FOXG_00480) Glucoamylase (FOXG_13566) Subtilisin (FOXG_01145)	
2. Important in mutant adaptation to chsV gene deletion and probably associated with plant invasion	$A(M) > A(W)$ in Glc (1)	NEP-like (FOXG_17014)	
	$A(W)$ in VTT $\leq A(W)$ in Glc (2 vs 1)	Ribonuclease T2 family (FOXG_12372)	
	$A(M)/A(W)$ in Glc ≥ 1 and lowered in VTT (1 vs 2) <i>(preferential synthesis in M for Glc and after switching to VTT, increased synthesis in W with possible sorption on the plant tissue)</i>	Unknown (FOXG_02393)	
3. Involved in pathogenicity and/or defensive response but probably without direct interaction with the host cell wall	$A(W) \geq A(M)$ in Glc (1)	Serine protease (FOXG_12263)	
	$A(W)$ in VTT $\geq A(W)$ in Glc (2 vs 1)	Unknown (FOXG_10324)	
	$A(M)/A(W)$ in Glc ≤ 1 , lowered in VTT or for both carbon sources $A(M)/A(W) < 1$ (1 vs 2)	Related to cell wall protein PhiA (FOXG_18408)	
	<i>(preferential synthesis in W as compared to M for both carbon sources, but difference between two strains more marked in VTT)</i>	LysM domain (FOXG_16948) O-glycosyl hydrolase activity (FOXG_08301) Alpha-galactosidase (FOXG_04398) Related to endoglucanase B (FOXG_08211) Carboxylic ester hydrolase (FOXG_11103) Oxidoreductase activity (FOXG_15404) Serine-type peptidase activity (FOXG_00292) Beta-fructofuranosidase (FOXG_03211)	
	4. Important for mutant adaptation, for growth and nutrient supply, not excluding association with pathogenicity	$A(M) \geq A(W)$ in Glc (1)	Chitin-binding glycosyl hydrolase 18 family (FOXG_10034)
		$A(W)$ in VTT $\geq A(W)$ in Glc (2 vs 1)	Alcohol dehydrogenase (FOXG_11406)
		S1 (W + M, Glc), S4 (W + M, VTT): $A(M)/A(W)$ in Glc and in VTT < 1 , yet lower for VTT (1 vs 2) <i>(preferential synthesis in M for Glc; after switching to VTT, increased synthesis in two strains)</i>	Amidase domain (FOXG_11632) Chitinase (FOXG_10748) Eight cysteine-containing domain (FOXG_03365) Unknown (FOXG_10940) Murein transglycosylase (FOXG_06359) 1,3-beta-glucanosyltransferase (FOXG_05331) Alpha-amylase (FOXG_16920) Trypsin (FOXG_13248) Putative arabinase (11736) Catalase peroxidase (FOXG_12260) Alkaline ceramidase (FOXG_15265) Chitinase 1 (FOXG_09583)

protease (FOXG_12263) is associated with 4287-VTT-15N pointing to the involvement of this protein in fungus pathogenicity (group 3 in Table 1); alpha-amylase (FOXG_16920) is also associated with VTT as a carbon source, but is closer to mutant strain as compared to serine protease, which supports inclusion of this protein in group 4, Table 1. The position of NEP-like (FOXG_1704) in Fig. 4 relates high abundance of this protein with glucose as a carbon source and indicate its importance in the two fungal strains, as proposed in Table 1, group 2. The fourth protein, chitin-binding glycosyl

hydrolase 18 family (FOXG_10034) is associated in Fig. 4 with mutant strain, practically independently on the carbon source (group 4 in Table 1). On the other part, most of the proteins in Fig. 4 present low PC1 and PC2 values, which points out that the abundances of these proteins are insufficient to explain their contribution in differences among cultures. Indeed, to propose proteins grouping, not only abundances but a combination of different criteria was applied as depicted in column 2 of Table 1.

4. Conclusions

In this work, secretome of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* was studied for the first time, providing experimental evidence on the potential involvement of several individual proteins in fungus pathogenicity. In quantitative approach, efficient metabolic labeling was achieved by introducing ¹⁵N potassium nitrate to the growth medium from the early stage of fungal propagation. Four pairs of differentially labeled cultures of the wild type 4287 strain and Δ chsV mutant, grown in glucose or in the presence of vascular tomato tissue were combined and, after trypsin digestion, the obtained samples were analyzed by capHPLC-ESI-QTOFMS and MS/MS. Comparative evaluation of the abundance changes occurring for individual proteins between virulent and non-virulent strains and the observed effect of host tissue on protein abundances, enabled to propose functional annotation of 35 proteins separating them in four groups according with the suggested role. The first group included seven proteins adhering to the plant tissue hence potentially involved in the initial stage of host invasion. Another group gathered eleven proteins whose contribution in virulence might not require direct interaction with the host cell wall. On the other hand, seventeen proteins of importance for compensative adjustment of mutant, those participating in growth and nutrients supply, not excluding their role in virulence, were brought together in two other groups (one of them consisted of three proteins apparently adsorbing on the plant tissue).

The above 35 proteins comprised carbohydrate-active enzymes, protein/peptide- and lipid hydrolyzing enzymes, effectors inactivating plant immunity during intrusion by fungus (NEP-like, serine protease and related proteins, GLEYA adhesion domain, LysM domain), several proteins catalyzing redox processes and few proteins of unknown function. Furthermore, Principal Component Analysis carried out for the abundances of individual proteins in all fungal cultures reinforced the importance of four proteins (serine protease, NEP-like, alpha-amylase and chitin-binding glycosyl hydrolase 18 family) weighing on differences among four cultures containing two strains and two carbon sources.

To get further evidence on the identity of proteins involved in fungal virulence, further studies are in progress focusing on the effect of living host cells on the secretome profiles in both strains.

Author Contributions

Kazimierz Wrobel: conceptualization, methodology, formal analysis, validation, data curation, supervision; **Katarzyna Wrobel:** conceptualization, visualization, writing-original draft, editing; PhD students **Moises Guerrero Esperanza** and **Bianey Garcia Lara:** formal analysis, investigation; **MIG Roncero:** investigation, resources; **Alma Rosa Corrales Escobosa:** funding acquisition, project administration, conceptualization, methodology, validation, investigation, data curation, supervision.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgements

The financial support from National Council of Science and Technology, Mexico (CONACYT, projects 294094, 253879) is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2019.116288>.

References

- [1] R. Dean, J.A.L. Van Kan, Z.A. Pretorius, K.E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P.D. Spanu, J.J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis, G.D. Foster, The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology, *Mol. Plant Pathol.* 13 (2012) 414–430, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.
- [2] C.B. Michielse, M. Rep, Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*, *Mol. Plant Pathol.* 10 (2009) 311–324, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>.
- [3] A. Di Pietro, M.P. Madrid, Z. Caracuel, J. Delgado-Jarana, M.I.G. Roncero, *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus, *Mol. Plant Pathol.* 4 (2003) 315–325, <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00180.x>.
- [4] L. Guo, L. Han, L. Yang, H. Zeng, D. Fan, Y. Zhu, Y. Feng, G. Wang, C. Peng, X. Jiang, D. Zhou, P. Ni, C. Liang, L. Liu, C. Mao, X. Fang, M. Peng, J. Huang, Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense causing banana vascular wilt disease, *PLoS One* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095543> e95543.
- [5] P.M. Houterman, D. Speijer, H.L. Dekker, C.G. de Koster, B.J. Cornelissen, M. Rep, The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants, *Mol. Plant Pathol.* 8 (2007) 215–221, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00384.x>.
- [6] E. Li, J. Ling, G. Wang, J. Xiao, Y. Yang, Z. Mao, X. Wang, B. Xie, Comparative proteomics analyses of two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that differ in pathogenicity, *Sci. Rep.* 5 (2015) 13663, <https://doi.org/10.1038/srep13663>.
- [7] L.J. Ma, H.C. Van Der Does, K.A. Borkovich, J.J. Coleman, M.J. Daboussi, A. Di Pietro, M. Dufresne, M. Freitag, M. Grabherr, B. Henrissat, P.M. Houterman, S. Kang, W.B. Shim, C. Woloshuk, X. Xie, J.R. Xu, J. Antoniw, S.E. Baker, B.H. Bluhm, A. Breakspear, D.W. Brown, R.A.E. Butchko, S. Chapman, R. Coulson, P.M. Coutinho, E.G.J. Danchin, A. Diener, L.R. Gale, D.M. Gardiner, S. Goff, K.E. Hammond-Kosack, K. Hilburn, A. Hua-Van, W. Jonkers, K. Kazan, C.D. Kodira, M. Koehrsen, L. Kumar, Y.H. Lee, L. Li, J.M. Manners, D. Miranda-Saavedra, M. Mukherjee, G. Park, J. Park, S.Y. Park, R.H. Proctor, A. Regev, M.C. Ruiz-Roldan, D. Sain, S. Sakthikumar, S. Sykes, D.C. Schwartz, B.G. Turgeon, I. Wapinski, O. Yoder, S. Young, Q. Zeng, S. Zhou, J. Galagan, C.A. Cuomo, H.C. Kistler, M. Rep, Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*, *Nature* 464 (2010) 367, <https://doi.org/10.1038/nature08850>.
- [8] R. Manikandan, S. Harish, G. Karthikeyan, Comparative proteomic analysis of different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* to exploit the differentially expressed proteins responsible for virulence on tomato plants, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 420, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00420>.
- [9] J.M. Paper, J.S. Scott-Craig, N.D. Adhikari, C.A. Cuomo, J.D. Walton, Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*, *Proteomics* 7 (2007) 3171–3183, <https://doi.org/10.1002/pmic.200700184>.
- [10] V. Phalip, F. Delalande, C. Carapito, F. Goubet, D. Hatsch, E. Leize-Wagner, P. Dupree, A. van Dorsseleer, J.M. Jeltsch, Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall, *Curr. Genet.* 48 (2005) 366–379, <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0040-3>.
- [11] E. Perez-Nadales, M.F.A. Nogueira, C. Baldin, S. Castanheira, M. El Ghalid, E. Grund, K. Lengeler, E. Marchegiani, P.V. Mehrotra, M. Moretti, V. Naik, M. Oses-Ruiz, T. Oskarsson, K. Schäfer, L. Wasserstrom, A.A. Brakhage, N.A.R. Gow, R. Kahmann, M.H. Lebrun, J. Perez-Martin, A. Di Pietro, N.J. Talbot, V. Toquin, A. Walther, J. Wendland, Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants, *Fungal Genet. Biol.* 70 (2014) 42–67, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.011>.
- [12] F.J. Fernández-Acero, T. Colby, A. Harzen, M. Carbú, U. Wieneke, J.M. Cantoral, J. Schmidt, 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors, *Proteomics* 10 (2010) 2270–2280, <https://doi.org/10.1002/pmic.200900408>.
- [13] A. Klimes, K.F. Dobinson, B.P. Thomma, S.J. Klosterman, Genomics spurs rapid advances in our understanding of the biology of vascular wilt pathogens in the genus *Verticillium*, *Annu. Rev. Phytopathol.* 53 (2015) 181–198, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120224>.
- [14] Y. Sun, X. Yi, M. Peng, H. Zeng, D. Wang, B. Li, Z. Tong, L. Chang, X. Jin, X. Wang, Proteomics of *Fusarium oxysporum* race 1 and race 4 reveals enzymes involved in carbohydrate metabolism and ion transport that might play important roles in banana *Fusarium* wilt, *PLoS One* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113818> e113818.
- [15] Z. Zhao, H. Liu, C. Wang, J.R. Xu, Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi, *BMC Genomics* 14 (2013) 274, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-274>.
- [16] M.P. Madrid, A.R. Di Pietro, M.I.G. Roncero, Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defense compounds, *Mol. Microbiol.* 47 (2003) 257–266, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03299.x>.
- [17] M. Martin-Urdiroz, M.P. Madrid, M.I.G. Roncero, Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*, *Microbiology* 150 (2004) 3175–3187, <https://doi.org/10.1099/mic.0.27236-0>.
- [18] M. Martin-Urdiroz, M.I.G. Roncero, J.A. Gonzalez-Reyes, Ruiz-Roldan C. ChsVb, A class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*, *Eukaryot. Cell* 7 (2008) 112–121, <https://doi.org/>

- 10.1128/EC.00347-07.
- [19] R. Prados-Rosales, J.L. Luque-García, R. Martínez-López, C. Gil, A. Di Pietro, The *Fusarium oxysporum* cell wall proteome under adhesion-inducing conditions, *Proteomics* 9 (2009) 4755–4769, <https://doi.org/10.1002/pmic.200800950>.
- [20] M. de Sain, M. Rep, The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 23970–23993, <https://doi.org/10.3390/ijms161023970>.
- [21] L. Bianco, G. Perrotta, Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: from sample preparation to secretome analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 5803–5829, <https://doi.org/10.3390/ijms16035803>.
- [22] C. Rampitsch, J. Day, R. Subramaniam, S. Walkowiak, Comparative secretome analysis of *Fusarium graminearum* and two of its non-pathogenic mutants upon deoxynivalenol induction in vitro, *Proteomics* 13 (2013) 1913–1921, <https://doi.org/10.1002/pmic.201200446>.
- [23] F. Yang, S. Jacobsen, H.J. Jørgensen, D.B. Collinge, B. Svensson, C. Finnie, *Fusarium graminearum* and its interactions with cereal heads: studies in the proteomics era, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 37, <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00037>.
- [24] N.A. Brown, J. Antoniw, K.E. Hammond-Kosack, The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: a refined comparative analysis, *PLoS One* 7 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033731> e33731.
- [25] F.E.N. Yang, J.D. Jensen, B. Svensson, H.J. Jørgensen, D.B. Collinge, C. Finnie, Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat, *Mol. Plant Pathol.* 13 (2012) 445–453, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00759.x>.
- [26] M.K. Jashni, I.H. Dols, Y. Iida, S. Boeren, H.G. Beenen, R. Mehrabi, J. Collemare, P.J. de Wit, Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity, and enhances fungal virulence, *Mol. Plant Microbe Interact.* 28 (2015) 996–1008, <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-15-0074-R>.
- [27] V. Girard, C. Dieryckx, C. Job, Job D. Secretomes, The fungal strike force, *Proteomics* 13 (2013) 597–608, <https://doi.org/10.1002/pmic.201200282>.
- [28] R. Aebersold, M. Mann, Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function, *Nature* 537 (2016) 347, <https://doi.org/10.1038/nature19949>.
- [29] M. Alfaro, J.A. Oguiza, L. Ramirez, A.G. Pisabarro, Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi, *J. Proteomics* 102 (2014) 28–43, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.001>.
- [30] W. Zhu, J.W. Smith, C.M. Huang, Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics, *BioMed Res. Int.* 2010 (2010), <https://doi.org/10.1155/2010/840518>, Article ID 840518.
- [31] M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, B. Kuster, Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1017–1031, <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6>.
- [32] R.D. Taylor, A. Saparno, B. Blackwell, V. Anoop, S. Gleddie, N.A. Tinker, Proteomic analyses of *Fusarium graminearum* grown under mycotoxin inducing conditions, *Proteomics* 8 (2008) 2256–2265, <https://doi.org/10.1002/pmic.200700610>.
- [33] J.W. Gouw, J. Krijgsveld, A.J. Heck, Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms, *Mol. Cell. Proteom.* 9 (2010) 11–24, <https://doi.org/10.1074/mcp.R900001-MCP200>.
- [34] I.N. Kaneva, J. Longworth, P.E. Sudbery, M.J. Dickman, Quantitative proteomic analysis in *Candida albicans* using SILAC-based mass spectrometry, *Proteomics* 18 (2018) 1700458, <https://doi.org/10.1002/pmic.201700278>.
- [35] O. Chahrouh, D. Cobice, J. Malone, Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 2–20, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.013>.
- [36] S.X. Yao, Y. Zhang, Y.L. Chen, H.T. Deng, J.Y. Liu, SILARS: an effective stable isotope labeling with ammonium nitrate-15N in rice seedlings for quantitative proteomic analysis, *Mol. Plant* 7 (2014) 1697–1700, <https://doi.org/10.1093/mp/ssu089>.
- [37] M.J. MacCoss, C.C. Wu, D.E. Matthews, J.R. Yates, Measurement of the isotope enrichment of stable isotope-labeled proteins using high-resolution mass spectra of peptides, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7646–7653, <https://doi.org/10.1021/ac0508393>.
- [38] B. Arsova, S. Kierszniowska, W.X. Schulze, The use of heavy nitrogen in quantitative proteomics experiments in plants, *Trends Plant Sci.* 17 (2012) 102–112, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.001>.
- [39] L.K. Pino, B.C. Searle, J.G. Bollinger, B. Nunn, B. MacLean, M.J. MacCoss, The Skyline ecosystem: informatics for quantitative mass spectrometry proteomics, *Mass Spectrom. Rev.* (2017), <https://doi.org/10.1002/mas.21540>.
- [40] A. Di Pietro, M.I.G. Roncero, Purification and characterization of a pectate lyase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* produced on tomato vascular tissue, *Physiol. Mol. Plant* 49 (1996) 177–185, <https://doi.org/10.1006/pmpp.1996.0047>.
- [41] D.M. Wessel, U.I. Flügge, A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Anal. Biochem.* 138 (1984) 141–143, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90782-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90782-6).
- [42] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [43] M.L. Medina, W.A. Francisco, Isolation and enrichment of secreted proteins from filamentous fungi, in: S. Posch (Ed.), 2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation, Humana Press, Totowa, NY, 2008, pp. 275–285.
- [44] Y. Wang, J. Wu, Z.Y. Park, S.G. Kim, R. Rakwal, G.K. Agrawal, S.T. Kim, K.Y. Kang, Comparative secretome investigation of *Magnaporthe oryzae* proteins responsive to nitrogen starvation, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 3136–3148, <https://doi.org/10.1021/pr200202m>.
- [45] B.C. King, K.D. Waxman, N.V. Nenni, L.P. Walker, G.C. Bergstrom, D.M. Gibson, Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi, *Biotechnol. Biofuels* 4 (2011) 4, <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-4>.
- [46] M. Franceschetti, A. Maqbool, M.J. Jiménez-Dalmaroni, H.G. Pennington, S. Kamoun, M.J. Banfield, Effectors of filamentous plant pathogens: commonalities amid diversity, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 81 (2017), <https://doi.org/10.1128/MMBR.00066-16> e00066-16.
- [47] S.L. Tucker, N.J. Talbot, Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi, *Annu. Rev. Phytopathol.* 39 (2001) 385–417, <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.385>.
- [48] T. Linder, C.M. Gustafson, Molecular phylogenetics of ascomycotal adhesins - a novel family of putative cell-surface adhesive proteins in fission yeasts, *Fungal Genet. Biol.* 45 (2008) 485–497, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.08.002>.
- [49] R. De Jonge, M.D. Bolton, B.P. Thomma, How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors, *Curr. Opin. Plant Biol.* 14 (2011) 400–406, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.005>.
- [50] R. de Jonge, B.P. Thomma, Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol.* 17 (2009) 151–157, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.01.002>.
- [51] T. Langner, V. Göhre, Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions, *Curr. Genet.* 62 (2016) 243–254, <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0530-x>.
- [52] H.C. van der Does, R.G. Duyvesteyn, P.M. Goltstein, C.C. van Schie, E.M. Manders, B.J. Cornelissen, M. Rep, Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells, *Fungal Genet. Biol.* 45 (2008) 1257–1264, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.06.002>.
- [53] N.A. Gow, J.P. Latge, C.A. Munro, The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function, *Microbiol. Spectr.* 5 (2017), <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>.
- [54] C. Roncero, A. Sanchez-Diaz, M.H. Valdivieso, Chitin synthesis and fungal cell morphogenesis, in: D. Hoffmeister (Ed.), *Biochemistry and Molecular Biology*, Springer, Cham, 2016, pp. 167–190.
- [55] M.D. Lenardon, C.A. Munro, N.A. Gow, Chitin synthesis and fungal pathogenesis, *Curr. Opin. Microbiol.* 13 (2010) 416–423, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.002>.
- [56] L.A. Walker, C.A. Munro, I. de Bruijn, M.D. Lenardon, A. McKinnon, N.A.R. Gow, Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins, *PLoS Pathol.* 4 (2008), <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000040> e1000040.
- [57] S. Selvaggini, C.A. Munro, S. Paschoud, D. Sanglard, N.A. Gow, Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, *An. Microbiol.* 150 (2004) 921–928, <https://doi.org/10.1099/mic.0.26661-0>.
- [58] P. Santhanam, H.P. van Esse, I. Albert, L. Faino, T. Nürnberger, B.P. Thomma, Evidence for functional diversification within a fungal NEP1-like protein family, *Mol. Plant Microbe Interact.* 26 (2013) 278–286, <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0222-R>.
- [59] A. Levasseur, F. Piumi, P.M. Coutinho, C. Rancurel, M. Asther, M. Delattre, B. Henrissat, P. Pontarotti, M. Asther, E. Record, FOLy: an integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds, *Fungal Genet. Biol.* 45 (2008) 638–645, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.01.004>.
- [60] D. Liu, J. Li, S. Zhao, R. Zhang, M. Wang, Y. Miao, Y. Shen, Q. Shen, Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources, *Biotechnol. Biofuels* 6 (2013) 149, <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-149>.
- [61] S.W. McCotter, L.C. Horianopoulos, J.W. Kronstad, Regulation of the fungal secretome, *Curr. Genet.* 62 (2016) 533–545, <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0578-2>.
- [62] R.D. Kulkarni, H.S. Kelkar, R.A. Dean, An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 118–121, [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00025-2).



Ref.: Ms. No. ACPD-D-19-01057R3

June 13th 2020

“Different approaches in metabolomic analysis of plants exposed to selenium: a comprehensive review”

Authors: Kazimierz Wrobel, Moises Guerrero Esperanza, Eunice Yanez Barrientos, Alma Rosa Corrales Escobosa, Katarzyna Wrobel
Acta Physiologiae Plantarum

Dear Dr. Wrobel,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Acta Physiologiae Plantarum.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

P. Wojtaszek
Editor-in-Chief
Acta Physiologiae Plantarum

As a result of the significant disruption that is being caused by the COVID-19 pandemic we are very aware that many researchers will have difficulty in meeting the timelines associated with our peer review process during normal times